

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFETS ANTICANCÉREUX DU RÉGIME MÉDITERRANÉEN : RÔLE DES
COMPOSÉS PHYTOCHIMIQUES DE L'HUILE D'OLIVE SUR L'ACTION DE
LA CYTOKINE PRO-INFLAMMATOIRE TNF-ALPHA DANS LES
GLIOBLASTOMES

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

AROUA BEN SAÂD

MAI 2015

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Avant tout, mes sincères remerciements s'adressent à mon directeur le Dr. Borhane Annabi, d'avoir accepté de m'offrir la chance de réaliser mes recherches au sein de son laboratoire. J'ai grandement apprécié vos gestes humanitaires, votre patience et votre présence tout au long de ma maîtrise. Vous étiez constamment à l'écoute et prêt à m'encourager dans les moments les plus difficiles. Aujourd'hui, vous représentez une personne remarquable dans ma carrière et je me rends compte à quel point vos conseils précieux et votre rigueur scientifique m'ont permis de développer mon esprit critique.

Je tiens à remercier la Dr. Sylvie Lamy pour toute l'aide, l'encadrement et l'assistance qu'elle m'a procurée durant mon séjour au laboratoire. Vos conseils précieux, votre perfectionnisme, votre sens d'analyse et surtout votre bonne humeur m'ont beaucoup aidé à réussir mon projet. Grâce à vous, j'ai pu acquérir un savoir-faire qui m'accompagnera certainement dans ma carrière scientifique.

Je remercie également Julie Poirier, Annie Levert, Khadija Haidara et Alain Zgheib pour leur aide technique et leurs conseils. Merci à tous mes collègues de laboratoire que j'ai connus pour les beaux moments inoubliables que nous avons partagés ensemble.

Une pensée particulière s'adresse à mon mari Amine pour tout l'amour qu'il m'offre à chaque jour et pour son soutien sur tous les niveaux. Ta présence illumine ma vie.

J'espère que notre fille Sarah lira ce mémoire un jour et saura à quel point tu m'as aidé et tu as été présent pour moi.

Les mots ne suffiront pas pour remercier mes très chers parents qui ont été mes anges gardiens tout au long de ma vie et je sais qu'ils continuent à l'être malgré la distance. Sachez que c'est bien dur de vivre si loin de vous. Je pense à vous à chaque seconde. Je n'oublierai jamais ce que vous avez sacrifié pour me donner l'opportunité d'évoluer et d'aller plus loin dans mes études. C'est une chance énorme de vous avoir comme parents. Un remerciement spécial s'adresse à ma sœur que je considère ma moitié à l'autre bout du monde, à mes frères, à ma grand-mère et à mes beaux-parents qui comptent parmi les êtres les plus chers dans ma vie.

Finalement, je tiens à remercier la Dr. Catherine Mounier pour ses conseils, sa gentillesse et sa disponibilité permanente.

Le présent projet a été financé par la chaire de recherche en prévention et traitement du cancer.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES ET ACCRONYMES.....	xi
RÉSUMÉ	xiii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1.1 Le cancer	3
1.1.1 Généralités	3
1.1.2 Statistiques	4
1.1.3 La cancérogenèse	5
1.1.4 Les glioblastomes.....	7
1.2 Inflammation et cancer	7
1.2.1 Impact de l'inflammation sur la progression tumorale	7
1.2.2 Le facteur de nécrose tumoral TNF- α	10
1.2.3 Les récepteurs du TNF- α	12
1.2.4 Le rôle du TNF- α dans l'inflammation et le cancer.....	13
1.3 Les voies de signalisation activées par le TNF- α	18
1.3.1 La voie NF- κ B	18
1.3.2 La voie des MAPKinases	21
1.4 Interaction tumeurs-endothélium vasculaire	26
1.4.1 L'angiogenèse tumorale	26
1.4.2 La migration cellulaire induite par le TNF- α	29
1.5 Nutrition et cancer	30

1.5.1 Les composés phytochimiques	30
1.5.2 Le régime méditerranéen	31
CHAPITRE II	
ARTICLE	41
OLIVE OIL COMPOUNDS INHIBIT THE PARACRINE REGULATION OF TNF- α -INDUCED ENDOTHELIAL CELL MIGRATION THROUGH REDUCED CYCLOOXYGENASE-2 EXPRESSION IN GLIOBLASTOMA CELLS	41
ABSTRACT	43
INTRODUCTION	45
MATERIALS AND METHODS	49
RESULTS	55
DISCUSSION	59
ACKNOWLEDGEMENTS	63
FIGURES	64
CHAPITRE III	
DISCUSSION	73
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	79
BIBLIOGRAPHIE	81

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1	Importance relative des gènes dans le développement du cancer..... 5
1.2	Les étapes de la cancérogenèse..... 6
1.3	Inflammation et cancer: un lien morbide..... 9
1.4	La balance entre la survie et la mort médiée par les membres de la superfamille du TNF- α 11
1.5	Cascade de signalisation menant à l'activation de l'apoptose et de la survie cellulaire par TNF- α 13
1.6	NF- κ B, un régulateur clé dans l'oncogenèse..... 14
1.7	Synthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique..... 17
1.8	Activation des gènes inflammatoires par la voie I κ B/NF- κ B induite par le TNF- α 20
1.9	Schématisation de la cascade d'activation de la voie ERK 23
1.10	Schéma récapitulatif des MAPKs, JNK et p38 activées par le TNF- α 25
1.11	Comparaison entre l'angiogenèse normale et l'angiogenèse tumorale 27
1.12	Migration des cellules endothéliales vers le foyer tumoral 29
1.13	Structures et différences chimiques de quelques composés phytochimiques retrouvés dans l'huile d'olive 33

[Cette page a été laissée intentionnellement blanche]

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Composés antioxydants présents dans l'huile d'olive	35

[Cette page a été laissée intentionnellement blanche]

LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES ET ACCRONYMES

AA	Acide arachidonique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AO	Acide oléique
ARN	Acide ribonucléique
BCL-X _L	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BHE	Barrière hémato-encéphalique
cIAP	Inhibiteur d'apoptose cytoplasmique
COX	Cyclooxygénase
DCR	<i>Decoy receptor</i>
EGF	Facteur de croissance épidermique
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
ER	<i>Estrogen receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FADD	<i>Fas associated-protein with death domain</i>
FGF	Facteur de croissance fibroblastique
GDP	Guanidine diphosphate
GPCR	Récepteurs couplés aux protéines G
GTP	Guanidine tris phosphate
HBMEC	Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines
HT	Hydroxytyrosol
I κ B	Inhibiteur de κ B
I κ K	kinase d'inhibition de κ B
IAPs	Inhibiteurs d'apoptose
IFN- γ	Interféron gamma
ILs	Interleukines
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
JNK	C-Jun N-terminal kinase
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase ERK kinase</i>
MEKK	<i>Mitogen-activated protein kinase ERK kinase kinase</i>
MMP	Métalloprotéinase matricielle
NIK	Kinase d'induction de NK- κ B
NK- κ B	Facteur nucléaire κ B

OL	Oleuropéine
OMS	Organisation mondiale de la santé
P38	Protéine 38
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PGE ₂	<i>Prostaglandins (E₂)</i>
PGG	<i>Prostaglandins Hydroxyperxy endoperoxide</i>
PGH ₂	<i>Prostaglandins Hydroxy Endoperoxide₂</i>
PGHS	<i>Prostaglandins H₂ synthase</i>
PPAR- γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-kinase
Ras	<i>Rat sarcoma proteins</i>
RelA	Facteur de transcription RelA protéine
RelB	Facteur de transcription RelB protéine
RIP	<i>Ribosome inactivating protein</i>
RTK	Récepteur tyrosine kinase
SAPK	<i>Stress-activated protein kinase</i>
Ser	Sérine
siRNA	<i>Single interfering RNA</i>
SODD	<i>Silencer of death domain</i>
SOS	<i>Son of sevenless</i>
TACE	Enzyme de conversion du TNF- α
TGF	Facteur de croissance transformant
Thr	Thréonine
TNF- α	Facteur de nécrose tumoral alpha
TNF-R	Récepteur au TNF- α
TRADD	<i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein</i>
TRAF1	<i>TNF receptor associated factor 1</i>
TRAF2	<i>TNF receptor associated factor 2</i>
Tyr	Tyrosol
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFI	Inhibiteur du VEGF
VEGF-R	Récepteur au VEGF
WRCF	World research cancer fund

RÉSUMÉ

L'inflammation est un phénomène qui accentue le développement des maladies chroniques et cancéreuses. Dans certains cas, elle induit une altération de la barrière hémato-encéphalique via la dérégulation de cellules immunitaires telles les macrophages et les lymphocytes T. Lors d'un dommage ou d'une infection, celles-ci s'activent, migrent au site infecté et libèrent les cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale TNF- α . Cette cytokine est fortement exprimée dans les glioblastomes et joue un rôle clé dans la progression tumorale cérébrale, un cancer hautement résistant aux traitements conventionnels. Ainsi, dans un cadre de prévention, l'inhibition du TNF- α représente une cible stratégique pour contrer l'inflammation associée au développement des glioblastomes. Étant donné que plus d'un tiers des cancers est relié aux habitudes alimentaires, les molécules d'origine nutraceutique représentent des agents de choix pour la chimioprévention. Plusieurs effets préventifs sur les maladies chroniques et cancéreuses ont été associés à la diète traditionnelle méditerranéenne basée essentiellement sur la consommation de l'huile d'olive. Ce nutriment est très riche en composés phytochimiques connus pour leurs pouvoirs anti-inflammatoires et antitumoraux. À ce jour, il n'existe pas d'études qui ont documenté les effets de l'huile d'olive sur le cancer du cerveau. Pour ce faire et afin de cibler l'action du TNF- α sur l'inflammation induite dans un modèle de glioblastome multiforme U-87, nous avons testé l'effet de quatre composés de l'huile d'olive soient l'hydroxytyrosol (HT), le tyrosol (Tyr), l'acide oléique (AO) et l'oleuropéine (OL) sur l'expression de COX-2 et de son produit de catalyse les prostaglandines (PGE₂), ainsi que sur les voies NF- κ B et MAPKs (ERK et JNK). Dans la présente étude, nous avons démontré que, parmi les quatre composés testés, Tyr et AO inhibent l'inflammation orchestrée par le TNF- α *in vitro* dans les cellules U-87. Cet effet se reflète sur l'inhibition de l'expression des COX-2 et a été confirmé par l'inhibition de la libération des PGE₂ dans le milieu extracellulaire. Nous avons également démontré que les facteurs de croissance sécrétés par les cellules U-87 en présence de Tyr et AO atténuent la migration des cellules endothéliales microvasculaires humaines du cerveau (HBMECs). Ceci nous renseigne sur l'effet de ces molécules sur l'interaction entre le microenvironnement tumoral et l'endothélium vasculaire. Nous suggérons que les mécanismes responsables de ces effets soient attribués à l'action inhibitrice des composés sur l'activation des voies de signalisation intracellulaires NF- κ B et MAPKs induites par le TNF- α . Notons que les effets de Tyr et AO sont observés à des concentrations qui peuvent être facilement absorbées par l'humain suite à une consommation d'huile d'olive. Ces découvertes permettent de mieux dévoiler les mécanismes cachés derrière l'activité anti-inflammatoire des molécules de l'huile d'olive. Globalement, notre étude suggère que

ces molécules diminuent l'activité du TNF- α dans l'inflammation associée au cancer du cerveau. Cela pourrait contribuer à promouvoir les propriétés chimiopréventives des molécules de l'huile d'olive et représentera un pas de plus dans notre compréhension des mécanismes pouvant favoriser la prévention des glioblastomes.

Mots clés : Glioblastome, inflammation, TNF- α , COX-2, régime méditerranéen, Tyrosol, Acide oléique, PGE₂.

INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, des études pathologiques et cliniques se sont intéressées à expliquer les effets positifs sur la santé associés au régime alimentaire des peuples vivant aux abords de la mer Méditerranée, notamment sur la prévention des maladies cardiovasculaires et de plusieurs types de cancer (Trichopoulou et Dilis, 2007). La diète méditerranéenne est pauvre en viandes rouges et en acides gras saturés dont la consommation abusive est nocive pour la santé. Elle est riche en légumes et fruits, sources importantes de fibres et d'antioxydants. Particulièrement, l'huile d'olive constitue la base essentielle du régime alimentaire méditerranéen et plusieurs études suggèrent que l'utilisation systématique de cette huile chez ces peuples pourrait être responsable en partie des effets préventifs sur les maladies cardiovasculaires et cancéreuses. En plus de son contenu en acides gras monoinsaturés, l'huile d'olive se distingue des autres huiles végétales (tournesol, soya et maïs) par la présence de plusieurs composés phénoliques qui lui confèrent une forte activité antioxydante et anti-inflammatoire (Cicerale *et al.*, 2009). La contribution de ces molécules aux effets anticancéreux et les mécanismes d'actions associés à la consommation d'huile d'olive demeurent cependant peu connus.

Le terme cancer englobe plus de 200 maladies différentes qui attaquent l'organisme vivant. Les cancers se distinguent des autres maladies par un taux élevé de mortalité et par une progression extrêmement rapide. Les glioblastomes font partie des tumeurs les plus vascularisées et agressives. Elles se caractérisent par un fort caractère infiltrant. Elles ont tendance à nécroser tous les tissus et les cellules adjacentes et à causer des phénomènes inflammatoires et des œdèmes (Khan *et al.*, 2012; Jinang *et al.*, 2010). Les glioblastomes sont des tumeurs cérébrales hautement résistantes aux traitements anticancéreux conventionnels. À ce jour, il n'existe pas de thérapie

efficace disponible ce qui incite les scientifiques à plutôt mettre en œuvre une démarche préventive (Khan *et al.*, 2012).

Des évidences cliniques et épidémiologiques suggèrent que le phénomène d'inflammation prédomine dans le cancer. Plusieurs recherches démontrent également que l'inhibition de l'inflammation chronique chez des patients atteints de maladies prémalignes, réduit les risques associés à celui-ci (Thun, Henley et Patrono, 2002). Un processus antitumorigène devra dans ce cas être envisagé dans le but d'atténuer cette inflammation. De nombreuses cytokines sont retrouvées au sein des foyers inflammatoires. L'une d'entre elles, le facteur de nécrose tumorale (TNF)-alpha, joue un rôle majeur dans l'orchestration de l'inflammation (Aggarwal, Shishodia, Sandur, *et al.*, 2006). Différentes recherches ont démontré l'implication de ce facteur dans le caractère invasif des glioblastomes (Ryu *et al.*, 2011), cependant aucune étude n'a été réalisée en vue d'évaluer les effets potentiels des composés majeurs de l'huile d'olive sur l'action du TNF- α contrairement à d'autres types de cancer (sein, prostate, côlon et intestins...).

Ceci nous mène à entreprendre une étude dont l'objectif initial consiste à déterminer les propriétés antitumorales et anti-inflammatoires des principaux composés phytochimiques présents dans l'huile d'olive afin de contrer la progression des glioblastomes. Le but principal de cette étude vise à identifier les mécanismes d'action de quatre composés majeurs de l'huile d'olive soient l'hydroxytyrosol (HT), le tyrosol (Tyr), l'acide oléique (AO) et l'oleuropéine (OL) sur l'action du TNF- α dans l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et la sécrétion des prostaglandines (PGE₂) par les cellules de glioblastome U-87 et d'évaluer la régulation paracrine des facteurs de croissance tumoraux sur la migration des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines (HBMECs).

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Le cancer

1.1.1 Généralités

Le terme cancer englobe plus de 200 maladies malignes qui attaquent le corps humain. Malgré l'avancement des outils diagnostics et de la recherche s'intéressant au cancer, l'efficacité des traitements demeure faible (Henriksen *et al.*, 2014). Comment se développe le cancer dans notre corps? Dans les conditions normales, les cellules de l'organisme subissent périodiquement des renouvellements constants et programmés, lors de dérèglements, du vieillissement ou d'altérations cellulaires. Ce renouvellement ordonné et constant est le secret du bon développement et du fonctionnement d'une cellule saine. En l'absence de cette alternative, certaines cellules deviennent incapables d'obéir aux signaux et aux messagers intracellulaires reçus et perdent leur capacité à conserver ce phénotype de régulation (Almeida et Barry, 2011). Ceci entraîne une multiplication et une différenciation anarchiques et incontrôlées de cellules anormales qui envahissent non seulement les tissus adjacents, mais également les organes distants de la tumeur primaire (Stratton, Campbell et Futreal, 2009). On parle alors de l'apparition de tumeurs. Ce genre de dysfonctionnement peut être déclenché dans n'importe quel tissu du corps et évoluer pour donner plusieurs types de cancer, dont chacun, est unique en son genre (Almeida et Barry, 2011).

1.1.2 Statistiques

Les cas de décès associés aux cancers sont élevés. Cette maladie maligne constitue la principale cause de mortalité au Canada et aux États-Unis depuis l'année 2005. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), une personne sur deux sera atteinte d'un cancer au cours de sa vie. Toutes les 3 minutes, un diagnostic de cancer a été annoncé à une personne durant l'année 2015, et 191 300 nouveaux cas sont estimés dans la même année dont 70 % toucheront les personnes âgées de 60 ans et plus (OMS), 76 600 décès seront causés par cette maladie chaque année (statistiques canadiennes sur le cancer, 2013). Ces statistiques ne cesseront d'augmenter pour atteindre près de 300 000 cas en 2030 au Canada (OMS cancer). Les cancers attaquent généralement les hommes plus que les femmes. Les plus fréquents sont celui de la prostate chez les hommes et celui du sein pour les femmes, ainsi que le cancer des poumons et du colon (Li *et al.*, 2012). Leur apparition est due à diverses causes telles que les mutations génétiques, l'exposition à des substances chimiques et des rayons et est étroitement liée aux habitudes et aux comportements alimentaires qui représentent 30 à 35% des cas (Anand *et al.*, 2008) (Figure 1.1).

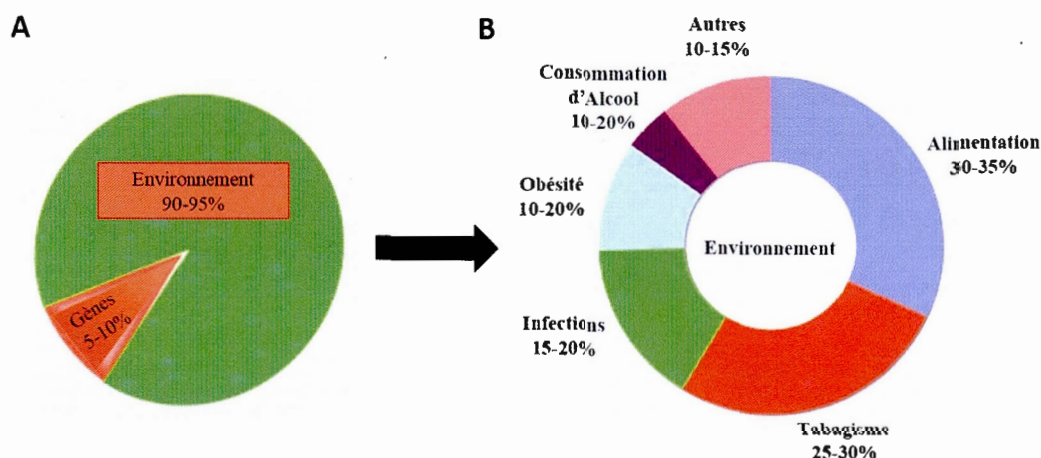


Figure 1.1 Importance relative des gènes dans le développement du cancer

(A) Le pourcentage de la contribution des facteurs génétiques et environnementaux dans le cancer. (B) Pourcentage de contribution de chaque facteur environnemental. Les pourcentages représentés indiquent la fraction attribuable aux décès par le cancer dus aux risques des facteurs environnementaux. Adaptée de (Anand *et al.*, 2008)

1.1.3 La cancérogenèse

Au cours du développement d'un cancer, plusieurs altérations affectent les gènes impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire ce qui permet aux cellules cancéreuses de développer une autosuffisance face aux signaux de croissance (Harris, 1996). Les cellules tumorales semblent ainsi acquérir une résistance à certains signaux antiprolifératifs normalement assimilés par la cellule, ce qui leur permet de croître, d'activer l'angiogenèse, de migrer et de proliférer d'une manière excessive (Folkman, J., 1995). Ces processus peuvent se développer sur plusieurs années et se font par l'intermédiaire de trois étapes majeures qui se résument dans: l'initiation, la promotion et la progression (Béliveau et Gingras, 2007) (Figure 1.2).

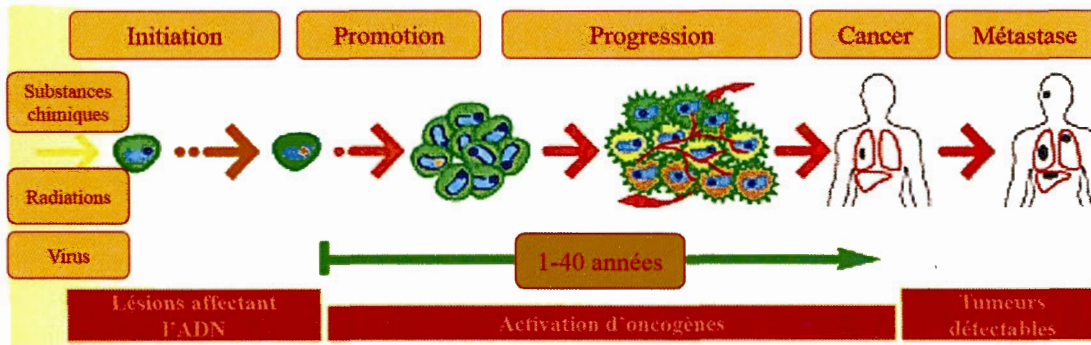


Figure 1.2 Les étapes de la cancérogenèse

Les cellules saines sont exposées à des agents cancérigènes externes et intègrent une phase de promotion où elles subissent une prolifération excessive. Les oncogènes s'activent pour amorcer la progression tumorale. Les tumeurs sont cliniquement diagnostiquées à ce stade. Adaptée de (Béliveau et Gingras, 2007)

La formation d'un environnement inflammatoire accentue la progression tumorale par la diffusion des globules blancs au foyer tumoral (Harris, 1996). De nombreuses enzymes telles que les cyclooxygénases (COX) et les métalloprotéinases matricielles (MMPs) contribuent à cette progression tumorale. En effet, lors du processus invasif, les cellules sécrètent les MMPs qui dégradent la matrice extracellulaire. Cette dernière est alors remodelée facilitant la migration des cellules de défense et cancéreuses. De telles conditions facilitent la capacité des cellules cancéreuses à proliférer et à envahir les tissus entraînant la formation des métastases (Hanahan et Weinberg, 2000 ; Harris, 1996).

1.1.4 Les glioblastomes

Les glioblastomes sont les tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes et les plus agressives. Un glioblastome est formé d'un groupe de cellules ayant subi une prolifération anormale à l'intérieur de l'encéphale (Yin *et al.*, 2008). Les glioblastomes multiformes sont des tumeurs cérébrales primaires les plus communes chez les adultes et comptent au moins 80% de gliomes malins. Ces tumeurs sont également connues sous le nom d'astrocytomes de grade IV. Les tumeurs cérébrales primaires causent la mort d'environ 12,000 patients chaque année au Canada et aux États-Unis (Société canadienne sur le cancer), (Khan *et al.*, 2012). Malgré les recherches avancées visant les traitements disponibles tels que la radiothérapie, la chimiothérapie et la chirurgie, la moyenne de survie des patients après le diagnostic ne s'est pas significativement améliorée ; la médiane de survie n'étant qu'à peine d'un an. Les gliomes malins sont hautement vascularisés et ont la capacité d'envahir et d'infiltrer les tissus cérébraux adjacents ce qui cause un dysfonctionnement des cellules normales. L'altération de plusieurs cascades de signalisation majeures, incluant la surexpression ou l'activation de facteurs de croissance ou des mutations de gènes suppresseurs de tumeurs, a été observé dans les glioblastomes (Khan *et al.*, 2012). De plus, comme ceux-ci ont tendance à nécroser, ils créent une inflammation du tissu cérébral et des œdèmes (Deininger *et al.*, 1999). Ces phénomènes mènent à une augmentation de la pression intracrânienne et sont à l'origine des divers symptômes délétères observés chez les patients atteints de glioblastomes (Chandana *et al.*, 2008).

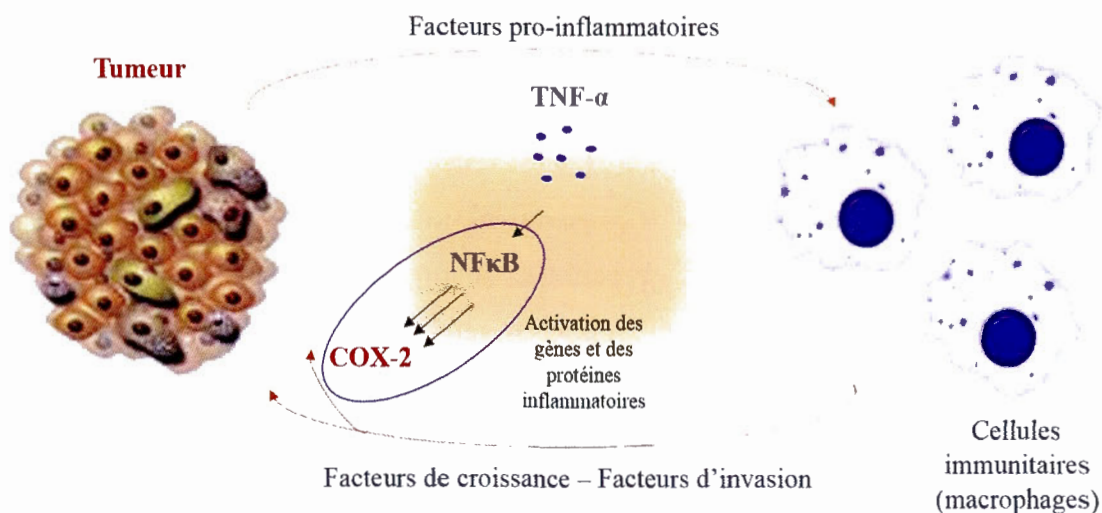
1.2 Inflammation et cancer

1.2.1 Impact de l'inflammation sur la progression tumorale

L'inflammation est un processus physiologique qui résulte d'une infection microbiologique pathogène, d'une irritation chimique ou d'une blessure (Philip, Rowley et Schreiber, 2004). Dans les conditions normales, les cellules immunitaires,

telles que les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes T, migrent vers les sites des lésions tissulaires pour maintenir la défense et contrer sa progression. Dans certains cas, un dérèglement de la réponse immunitaire survient. Les cellules deviennent incapables de contrer l'agent pathogène ou l'infection et le développement d'une inflammation chronique survient (Lu, Ouyang et Huang, 2006). Les macrophages sont alors constamment actifs et produisent des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumoral-alpha (TNF- α) et les interleukines (ILs), d'enzymes inflammatoires (COX-1 et COX-2, MMPs...) et de facteurs de croissance menant collectivement à un dommage de l'ADN et des tissus. Tous ces éléments contribuent à une prolifération cellulaire excessive et préparent un terrain favorable à l'installation de la tumeur et à sa migration vers les tissus adjacents (Figure 1.3) (Macarthur, Hold et El-Omar, 2004).

Plus précisément, des études suggèrent que le TNF- α jouerait le rôle de médiateur entre l'inflammation et le cancer (Sethi, Sung et Aggarwal, 2008). L'existence d'un lien entre l'inflammation chronique et le cancer fut établie depuis plus de 150 ans lorsque Virchow a découvert que les cancers ont tendance à se développer dans les foyers d'inflammations chroniques (Balkwill et Mantovani, 2001).



1.3 Inflammation et cancer: un lien morbide

Les cellules cancéreuses utilisent l'inflammation pour progresser. Elles secrètent des messages destinés aux cellules inflammatoires situées à proximité, les forcent à relâcher un grand nombre de facteurs de croissance et de cytokines inflammatoires (TNF- α). Ces facteurs activent le facteur nucléaire NF- κ B qui augmente considérablement la production d'enzymes (COX-2, MMPs...). Adaptée de (Béliveau et Gingras, 2006)

Diverses études épidémiologiques supportent l'hypothèse que les maladies inflammatoires chroniques sont fréquemment associées à un risque plus élevé de cancers dans plus de 25 % des cas (Okada, 2014 ; Schetter, Heegaard et Harris, 2010). En effet, un microenvironnement inflammatoire implique un réseau de cellules et de voies de transduction de signal qui sont indispensables à la progression tumorale. Ce réseau facilite l'angiogenèse et sert à activer le développement, l'invasion et le développement de métastases dans les cellules cancéreuses. A ce titre, des études ont démontré que la régulation à la baisse de l'inflammation chez des sujets prédisposés au cancer serait en mesure de réduire les risques associés à la progression de celui-ci. Ainsi, une régulation adéquate de la réponse inflammatoire

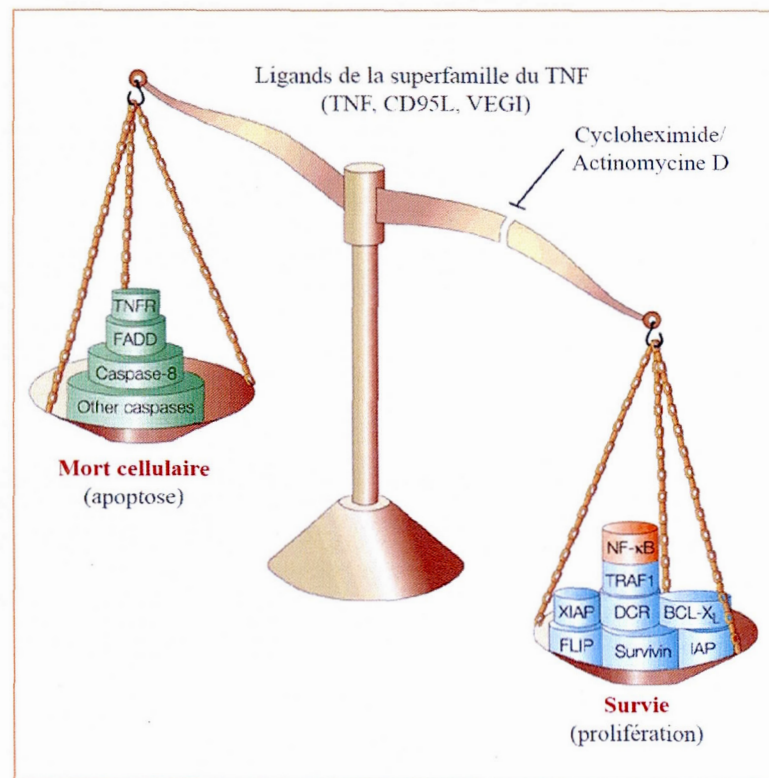
peut être envisagée comme un processus antitumorigène (Lu, Ouyang et Huang, 2006 ; Schetter, Heegaard et Harris, 2010 ; Thun, Henley et Patrono, 2002).

1.2.2 Le facteur de nécrose tumoral TNF- α

Le facteur de nécrose tumorale TNF- α est une glycoprotéine composée de 157 acides aminés. Il a été isolé en 1975 à partir du sérum d'une souris traitée avec une endotoxine bactérienne ayant comme composé actif la toxine de Coley (van Horssen, Ten Hagen et Eggermont, 2006). Cette étude avait montré l'induction d'une nécrose hémorragique des tumeurs de la souris. Des années après son isolation, le TNF- α a été caractérisé comme étant un facteur de différenciation des lymphocytes T. Il appartient à la famille des cytokines inflammatoires et a été caractérisé comme le facteur clé dans la majorité des maladies inflammatoires (van Horssen, Ten Hagen et Eggermont, 2006).

Chez les humains, le gène TNF- α est localisé sur le chromosome 6. Il est principalement produit suite à l'activation des macrophages, des monocytes et des lymphocytes T. Dans les cellules, le TNF- α est synthétisé sous forme de Pro-TNF qui est lié à la membrane et libéré lors du clivage de son prodomaine par l'enzyme de conversion du TNF- α (TACE) (Saklatvala, Davis et Guesdon, 1996 ; van Horssen, Ten Hagen et Eggermont, 2006).

Le TNF- α intervient aussi bien dans l'apoptose que dans la survie et la prolifération cellulaire. Dans les conditions basales et lorsque sa sécrétion est contrôlée, le TNF- α tend à établir un certain équilibre entre les processus cités précédemment (Figure 1.4). Il joue un rôle essentiel dans les réponses immunitaires et les phases inflammatoires (Aggarwal, 2003 ; van Horssen, Ten Hagen et Eggermont, 2006).



1.4 La balance entre la survie et la mort médiée par les membres de la superfamille du TNF- α

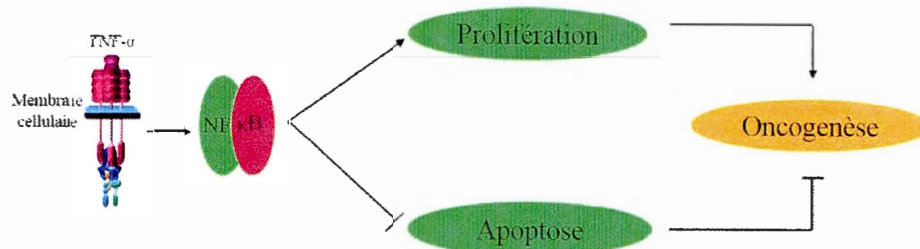
TNF- α ainsi que d'autres ligands de sa superfamille (VEGI (Vascular endothelial growth inhibitor), CD95L...) jouent un rôle de médiation entre les signaux apoptotiques et prolifératifs. L'activation de la voie anti-apoptotique se fait par NF- κ B et implique TRAF1 (TNF receptor associated factor 1), les inhibiteurs d'apoptose 1 et 2 (IAP1 et 2), les survivines, les BCL-X_L (B-cell lymphoma-extra large), les DCR (Decoy receptor). Ces protéines inhibent les différentes étapes de l'apoptose. Par exemple, le DCR bloque les récepteurs, les survivines inhibent l'activation de la caspase-3 et 8 qui activent la voie de l'apoptose, l'IAP diminue la caspase 9 tandis que les BCL-X_L empêchent la mitochondrie de libérer le cytochrome-c pour inhiber ainsi l'activation de la caspase 9. Adaptée de (Aggarwal, 2003)

1.2.3 Les récepteurs du TNF- α

L'action du TNF- α est amorcée dès sa liaison à ses deux récepteurs membranaires TNF-R1 (p55 ou D120a) et TNF-R2 (p75 ou D120b) qui, après activation, sont eux-mêmes couplés à des cascades de signalisation intracellulaires induisant le déclenchement de la réponse inflammatoire (Al-Lamki et Mayadas, 2014 ; Sama *et al.*, 2012). Le TNF- α se lie au TNF-R1 pour activer diverses cascades menant essentiellement à l'apparition de deux processus : l'apoptose (via la caspase 3, 8 et 9) et la prolifération cellulaire (via l'activation des gènes pro-inflammatoires) (figure 1.5) (van Horssen, Ten Hagen et Eggermont, 2006). TNF-R1 est le plus impliqué dans les processus pathologiques, alors que TNF-R2 est connu plutôt pour sa capacité à déclencher le chevauchement des événements de signalisation intracellulaire (Mao *et al.*, 2010 ; Zhang, H. L. *et al.*, 2012). Au niveau des macrophages, les effets anti-inflammatoires du TNF- α sont régulés via TNF-R2 (Masli et Turpie, 2009).

directement activer la progression du cancer en facilitant la prolifération et la survie des cellules néoplasiques (van Hørsen, Ten Hagen et Eggermont, 2006).

Mis à part son pouvoir inflammatoire, le $\text{TNF-}\alpha$ présente des propriétés antitumorales qui se résument dans son habileté à activer la Caspase-3 et à induire l'apoptose. L'ensemble de ces propriétés le classe parmi un des facteurs le plus impliqué dans les maladies ayant des phases inflammatoires et immunitaires notamment dans les cancers (Sama *et al.*, 2012 ; Zhang, H. L. *et al.*, 2012). La production constitutive de $\text{TNF-}\alpha$ par le microenvironnement tumoral et inflammatoire est une caractéristique de plusieurs tumeurs malignes et est souvent associée à des pronostiques défavorables. Dans la plupart des cancers, $\text{TNF-}\alpha$ active $\text{NF-}\kappa\text{B}$ qui entraîne l'expression des gènes associés à l'inflammation telle que l'augmentation de l'expression des cyclooxygénases-2 (COX-2) (Schetter, Heegaard et Harris, 2010 ; Wu et Zhou, 2010).



1.6 $\text{NF-}\kappa\text{B}$, un régulateur clé dans l'oncogenèse

$\text{NF-}\kappa\text{B}$ a un double rôle: En plus de promouvoir la croissance cellulaire, son activation inhibe la voie apoptotique supportant ainsi l'oncogenèse. Adaptée de (Lin et Karin, 2003)

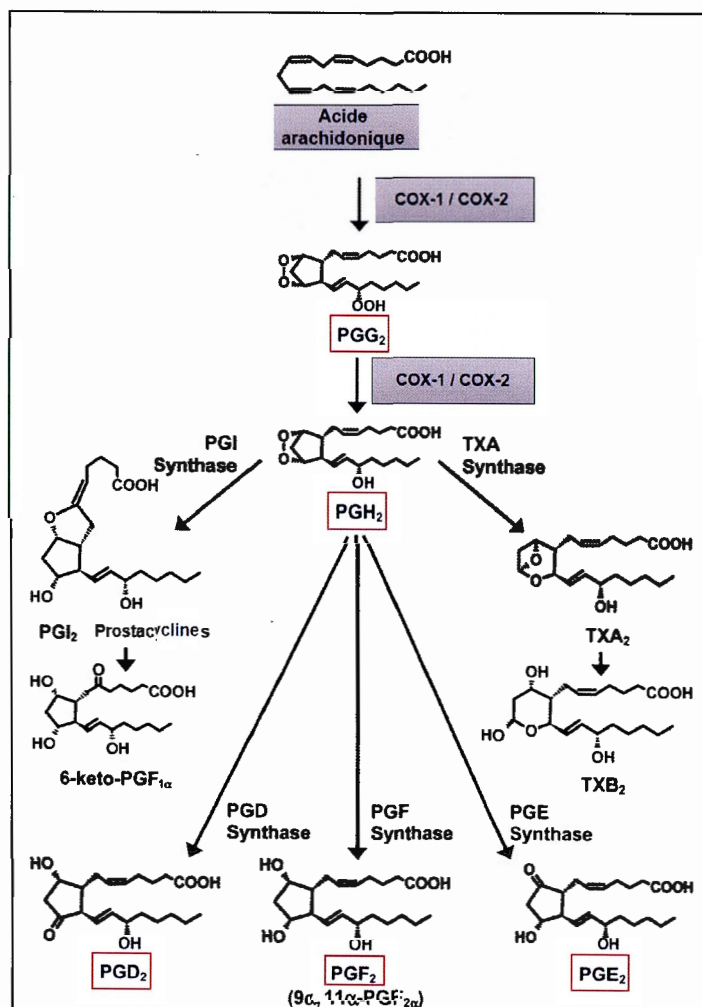
De telles activations sont associées à différents aspects de l'oncogénèse, spécialement dans la prolifération cellulaire cancéreuse, dans l'inhibition de l'apoptose et dans l'augmentation des métastases. Ces activations, induites par le TNF- α , contribuent significativement au développement du cancer à travers l'inflammation (Schetter, Heegaard et Harris, 2010 ; Wu et Zhou, 2010).

1.2.4.1 L'activation des COX-2 par le TNF- α

Les COXs sont des complexes enzymatiques purifiés en 1976 et clonés en 1988 (Vane, Bakhle et Botting, 1998) et comptent trois membres dans leur famille: les COX-1, les COX-2 et les COX-3. Les COX-1 montrent une expression généralement constante dans les conditions pathologiques et physiologiques (Smith, Garavito et DeWitt, 1996). Les COX-3 présentent une séquence d'acides aminés différente des COX-1 (rétention de l'intron-1), et ne semblent pas être impliqués dans la synthèse des prostaglandines chez les humains (Kis, Snipes et Busija, 2005). Contrairement aux autres cités précédemment, les COX-2 jouent un rôle important dans la réponse inflammatoire, dans le contrôle de la croissance cellulaire et dans la synthèse des prostaglandines (Vane, Bakhle et Botting, 1998). Ils sont inductibles aux sites inflammatoires par les facteurs pro-inflammatoires (cytokines : TNF- α et interférons : IFN- γ ...) (Hussein *et al.*, 2012 ; Onguru *et al.*, 2008). De plus, ils sont présents au niveau du cerveau et du cortex où ils sont impliqués dans la transmission nerveuse, particulièrement lors de l'induction de la fièvre et de la douleur. Au sein des tumeurs gliales, les COX-2 sont impliqués dans l'angiogenèse, la progression et l'invasion tumorale (Onguru *et al.*, 2008)

Ces enzymes appelés également prostaglandines H₂ synthétase (PGHS) jouent un rôle primordial dans l'activation de la voie de la biosynthèse de la prostaglandine, un médiateur important dans le processus inflammatoire. En effet, cette cascade de synthèse est déclenchée par l'acide arachidonique (AA) (Hussein *et al.*, 2012) qui est

libéré à partir des phospholipides de la membrane cellulaire par les phospholipases A2, C et D. En adoptant un métabolisme dépendant de l'activité des COXs, il s'oxyde pour produire le PGG₂ (Hydroperoxy endoperoxide) qui s'oxyde à son tour pour synthétiser le PGH₂ (Hydroxy Endoperoxyde) (Simmons, Botting et Hla, 2004). À ce niveau, une panoplie de mécanismes enzymatiques et non enzymatiques interviennent pour transformer le PGH₂ en prostaglandines E2 (PGE₂) et en d'autres prostanoïdes primaires (Burdan, Chalas et Szumilo, 2006) (Figure 1.7). La surexpression des COX-2 a été observée chez plusieurs cancers humains incluant le cancer du sein, du côlon, de la peau et de la prostate (Ruegg, Dormond et Mariotti, 2004). La région promotrice du gène COX-2 démontre des séquences de reconnaissance pour une variété de facteurs transcriptionnels dont NF-κB qui est un coordonnateur clé dans l'oncogenèse et le processus inflammatoire (Huang *et al.*, 2003).



1.7 Synthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique

En présence des cyclooxygénases, l'acide arachidonique induit les deux premières étapes de la production des prostaglandines PGG₂ et PGH₂ qui produisent les prostaglandines PGF₂, PGD₂ et PGE₂ (responsable de l'inflammation médiée par les COX-2) par le biais de diverses enzymes. Adaptée de (Simmons, Botting et Hla, 2004)

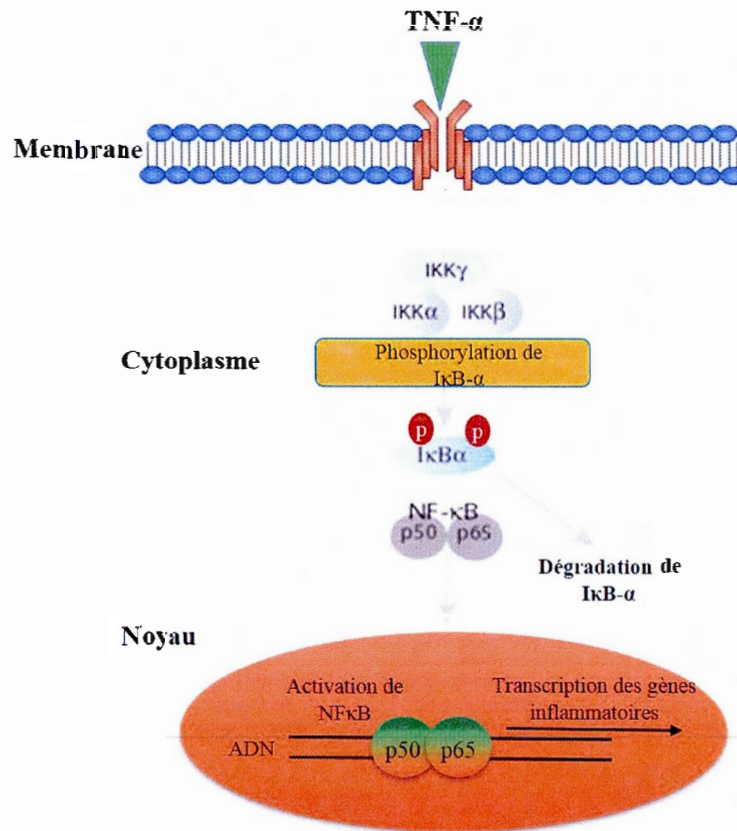
1.3 Les voies de signalisation activées par le TNF- α

1.3.1 La voie NF- κ B

Le facteur nucléaire kappa B (NF κ B) est un facteur de transcription qui joue un rôle majeur dans le système immunitaire (Bonizzi et Karin, 2004). Il régule l'expression de certaines cytokines, de l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS), des COXs et des facteurs de croissance tels que le facteur de croissance épidermique (EGF) et le facteur de croissance transformant (TGF) (Lin et Karin, 2003). Il agit comme activateur de la prolifération et de la survie cellulaire, et empêche l'induction de l'apoptose (van Horssen, Ten Hagen et Eggermont, 2006). Une dérégulation de cette voie alimente les maladies auto-immunes et inflammatoires, dont les maladies tumorales (Memet, 2006). Il appartient à une famille composée de cinq facteurs de transcription : p50, p52, RelA (p65), cRel et RelB. p52 et p50 sont activés par leurs précurseurs respectifs p100 et p105. Les sous unités de la famille NF- κ B activent les gènes via leur région d'homologie Rel, un domaine de liaison et de dimérisation hautement conservé. L'hétérodimère composé des sous-unités p50 et p65 reconnaît les sites κ B se trouvant dans les régions promotrices cis du gène et modulent son expression génique (Lin et Karin, 2003).

En plus de son implication dans les maladies chroniques inflammatoires, une activation continue de ce gène a été documentée chez les sujets atteints de leucémie, de lymphome ainsi que du cancer du côlon, de la prostate et des ovaires (Rayet et Gelinas, 1999). L'activation de la voie NF- κ B initie une cascade d'événements résultant de la formation du complexe TNF- α -TNFR-1. Lors de cette liaison, la protéine SODD (silencer of death domain) est libérée, la protéine TRADD se lie alors au domaine de mort (DD) du TNFR-1, et recrute les protéines adaptatrices : RIP, TRAF-2, et FADD, qui, à leurs tours recrutent des molécules clés qui sont responsables d'activer divers signaux intracellulaires (Rath et Aggarwal, 1999). Lorsque le TNFR-1 est activé, la survie cellulaire est induite. La protéine TRAF-2 est

recrutée au complexe formé préalablement cité, et inhibe la voie de l'apoptose en activant la protéine cIAP (inhibiteur d'apoptose cytoplasmique) (van Horssen, Ten Hagen et Eggermont, 2006). La résultante majeure de la signalisation des protéines TRAF-2 et RIP, s'illustre dans l'activation NF- κ B, via l'activation de la kinase d'induction de NF- κ B (NIK), la kinase d'inhibition de κ B (IKK) et la phosphorylation de l'inhibiteur de κ B (I κ B). Dans certains cas, NF- κ B peut être bloqué par une surexpression de son inhibiteur I κ B qui le retient au niveau cytosolique, empêchant par la suite la transcription au niveau du noyau. Dans les cas courants, des altérations survenant dans le gène I κ B diminuent sa capacité à inhiber NF- κ B et une activation de celui-ci a lieu (Cabannes *et al.*, 1999). Les cellules témoignent alors de la translocation de NF- κ B vers le noyau, facteur qui induit la transcription des gènes antiapoptotiques, prolifératifs, immunomodulateurs et inflammatoires (Degterev, Boyce et Yuan, 2003 ; van Horssen, Ten Hagen et Eggermont, 2006) (Figure 1.8).



1.8 Activation des gènes inflammatoires par la voie IκB/NF-κB induite par le TNF-α

TNF-α phosphoryle le complexe IκB-α qui est dégradé par le protéasome. Il phosphoryle à son tour le facteur nucléaire κB (NF-κB) qui sera transloqué dans le noyau pour activer la transcription des gènes inflammatoires. Adaptée de (Lin et Karin, 2003)

1.3.2 La voie des MAPKinases

1.3.2.1 Généralités

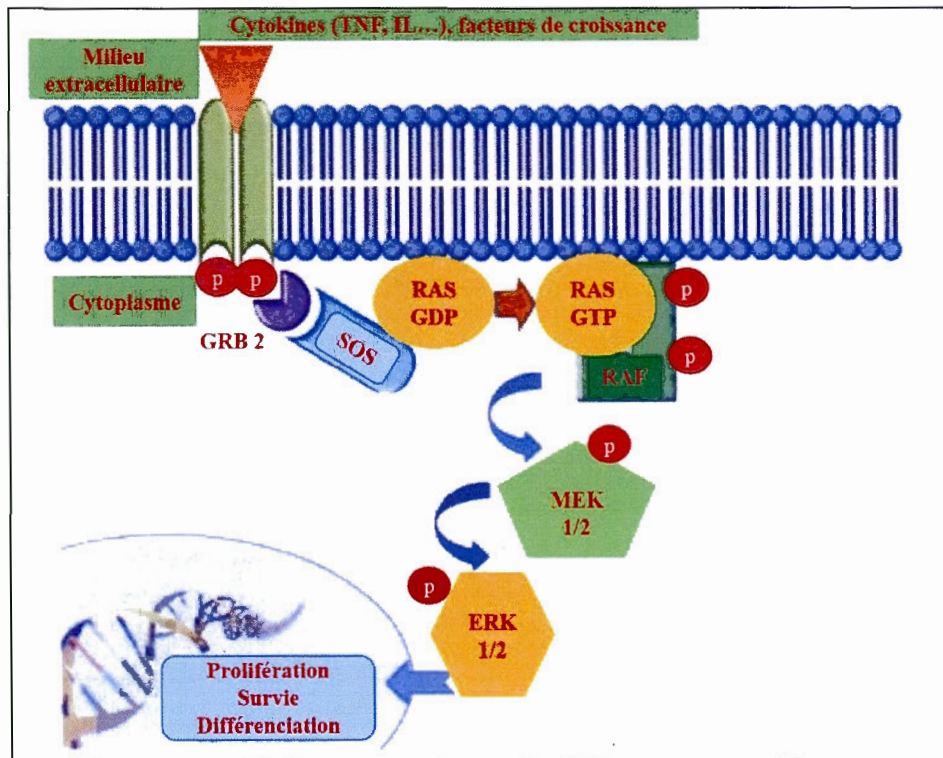
Les MAPKs (Mitogen Activated Proteins Kinases) sont des enzymes intracellulaires hautement responsables des altérations oncogéniques. Elles sont impliquées dans les processus biologiques incluant la prolifération et la survie cellulaire, l'apoptose, la migration cellulaire et la réponse au stress (Kyriakis et Avruch, 2001). Elles sont activées par le biais de plusieurs récepteurs dont le EGFR (epidermal growth factor receptor) et en réponse à différentes cytokines telles que le TNF- α et les ILs mais également aux facteurs de croissance tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Meister *et al.*, 2013). Elles chapeautent la transcription des gènes nécessaires à la réplication de l'ADN qui accentuent la prolifération et la différenciation cellulaire (Boucherit *et al.*, 2012). La famille des MAPKs regroupe différentes protéines dont ERK1/2 et ERK-5 (extracellular regulated protein kinase), JNK (c-Jun amino-terminal-kinase) et p38 Kinase. L'activation de ces MAPKs induit la transcription des gènes pro-inflammatoires tels que les COXs (Meister *et al.*, 2013 ; Nishimoto et Nishida, 2006).

1.3.2.2 La voie ERK

La voie ERK représente le point d'intérêt dans la voie de signalisation des MAPKinases chez les mammifères. Elle est impliquée notamment dans la division, la croissance et la prolifération cellulaires. Il existe, à ce jour, 8 isoformes connus de ERK (1 à 8) (Meister *et al.*, 2013). Cependant, les chercheurs s'intéressent essentiellement aux isoformes 1 et 2 et les nomment également et respectivement p42/p44. Les protéines ERK1/2 ont approximativement les mêmes fonctions grâce à leur structure hautement similaire formée de 360 acides aminés. Ce sont des kinases sérine/thréonine qui nécessitent la phosphorylation des groupements Ser/Thr pour être activées (Fischer *et al.*, 2005 ; Meister *et al.*, 2013).

La voie ERK s'active suite à la stimulation par un facteur de croissance, une cytokine ou simplement un stress osmotique. Elles induisent l'expression des gènes et affectent les diverses phases du cycle cellulaire (Adachi, Fukuda et Nishida, 1999). Ces kinases sont capables non seulement de moduler la transcription des gènes mais également de cibler et d'activer plusieurs récepteurs nucléaires tels que le ER (estrogen receptor), un récepteur surexprimé dans le cancer du sein, ou l'expression de PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) (Kato *et al.*, 1995 ; Madak-Erdogan *et al.*, 2011).

La voie ERK est activée par des familles de récepteurs membranaires tels que les récepteurs tyrosines kinases et les GPCR. Ceux-ci permettent l'émission des signaux actifs par différentes isoformes de la petite protéine GTPase-Ras (Roux et Blenis, 2004). SOS (Son of sevenless) et GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2) permettent la transmission du signal des récepteurs vers Ras. Puis, SOS échange GDP en GTP au niveau de Ras. Ceci permet à Ras d'interagir avec une panoplie de protéines effectrices dont la sérine/thréonine Raf kinase. Une fois la protéine Raf activée, elle phosphoryle les kinases MEK1 et MEK2 qui phosphorylent à leur tour ERK1/2 en bout de la cascade (Figure 1.9). En effet, il a été prouvé que Ras et Raf jouent un rôle crucial dans la prolifération cellulaire et dans l'activation des gènes impliqués dans l'oncogenèse (Geyer et Wittinghofer, 1997).



1.9 Schématisation de la cascade d'activation de la voie ERK

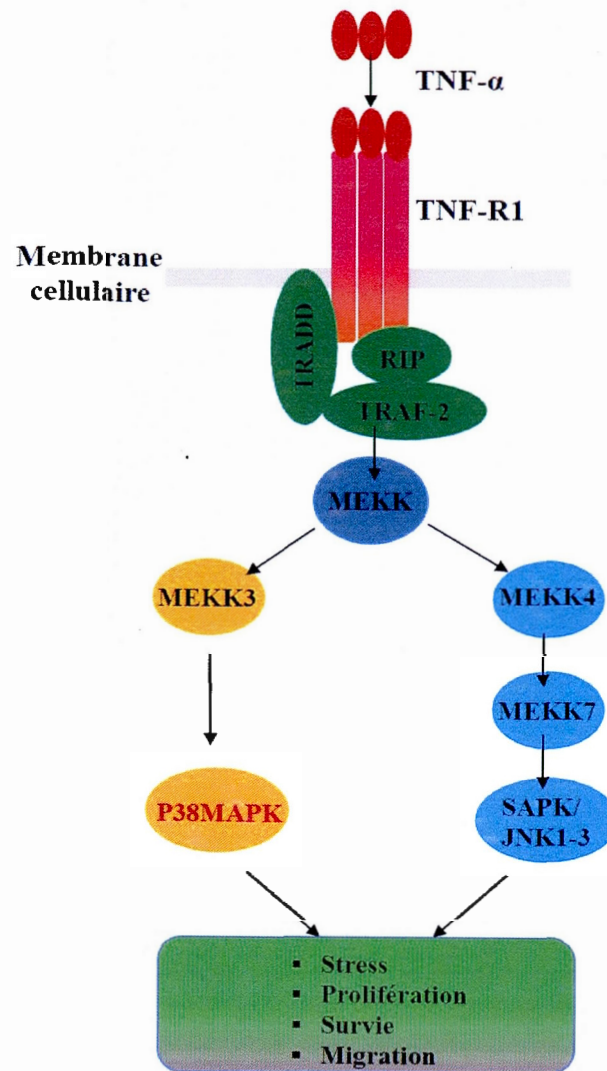
L'activation des récepteurs membranaires par les facteurs de croissance et les cytokines inflammatoires activent RAS à travers SOS et GRB2. Une fois activé, RAS interagit avec RAF pour phosphoryler MEK1/2 et activer ERK1/2. Adaptée de (Meister *et al.*, 2013)

1.3.2.3 La voie JNK

La voie c-Jun amino-terminal connue aussi sous le nom de SAPK/JNK (Stress activated protein kinase) est représentée par trois isoformes : JNK1/2/3 (Qi et Elion, 2005). Ce sont les JNK1/2 qui suscitent le plus l'intérêt de la part des chercheurs et sont exprimés de façon ubiquitaire tandis que JNK3 l'est au niveau du cœur et du

cerveau. Cette voie est activée suite à l'exposition à des cytokines inflammatoires ou à des stimulations de stress (Pombo *et al.*, 1994).

Elle occupe une partie importante dans la régulation des MAPKs. La voie JNK répond à plusieurs stimulations et peut être surexprimée en réponse à une douzaine de MAPK kinase kinases (MAPKKKs). Il existe plus de quatre MAPKKKs impliquées dans l'activation de JNK par le TNF- α et l'IL-1. Les JNKs phosphorylent les protéines Jun sur les sérines 63 et 73 (Chang et Karin, 2001). Ils sont exprimés chez les mammifères et sont activés par les MEK4/7 qui sont phosphorylés par les MAPKKs, MEKK 1, 2, 3, 4. Les MEK4/7 activent JNK1/2/3 par l'ajout de deux phosphates au niveau des résidus tyrosine et thréonine à motif conservé Thr-Pro-Tyr (PTY). À leur état inactif, les protéines JNKs demeurent dans le cytoplasme, elles sont transloquées dans le noyau une fois activées. Elles y agissent en modulant les gènes et les facteurs de transcription (Qi et Elion, 2005). L'activation des MEKKs activant la voie JNK est souvent couplée à l'activation d'autres MEKKs (MEKKs 3) conduisant à la phosphorylation de la p38/kinase pour induire les processus cellulaires comme la prolifération et la survie cellulaire (Liang *et al.*, 2014) (Figure 1.10).



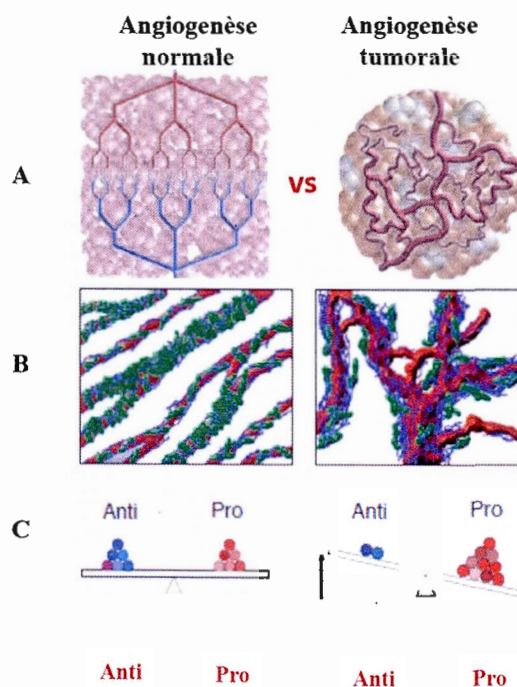
1.10 Schéma récapitulatif des MAPKs, JNK et p38 activées par le TNF-α

Le TNF-α induit la phosphorylation des MEKKs 1, 3, 4, 7 pour activer les MAPKs p38 et SAPK/JNK. Ces protéines induisent les processus de survie, de prolifération, et de migration cellulaires pour accentuer le développement tumoral. Adaptée de (Lin et Karin, 2003)

1.4 Interaction tumeurs-endothélium vasculaire

1.4.1 L'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse est un processus complexe qui sollicite la prolifération et la migration des cellules endothéliales tapissant les vaisseaux sanguins pour former de nouveaux capillaires et vaisseaux sanguins à partir d'autres qui existent déjà (Kisucka *et al.*, 2006). Elle est essentielle à l'accomplissement de différents processus physiologiques tels que le renouvellement et la réparation des tissus et le développement embryonnaire (Folkman, J., 1995 ; Munoz-Chapuli, 2011). Ce phénomène est hautement régulé chez les vertébrés via la coordination de protéines dotées de fonctions pro et antiangiogéniques. Les facteurs pro-angiogéniques incluent le VEGF, le facteur de croissance fibroblastique (FGF), le TGF et plusieurs chimiokines. Quant aux facteurs antiangiogéniques, ils incluent les thrombospondine-1 et les endostatines (Kisucka *et al.*, 2006). Par ailleurs, la perte de la balance appropriée entre ces facteurs est connue sous le nom de "switch" angiogénique et soutient le développement des tumeurs malignes (Sakurai et Kudo, 2011). Contrairement à l'angiogenèse physiologique où les vaisseaux sont organisés d'une manière hiérarchique (artères, capillaires et veines), les nouveaux vaisseaux créés au sein de la tumeur sont dotés d'une anatomie anormale caractérisée par des branchements irréguliers et non hiérarchiques (Cao *et al.*, 2011). Les nouveaux vaisseaux formés sont dilatés et possèdent une paroi mince qui les rend hyperperméables aux petites molécules et aux protéines plasmatiques facilitant ainsi l'angiogenèse et la migration cellulaire (Dvorak, 2005 ; Folkman, J., 1995) (Figure 1.11).

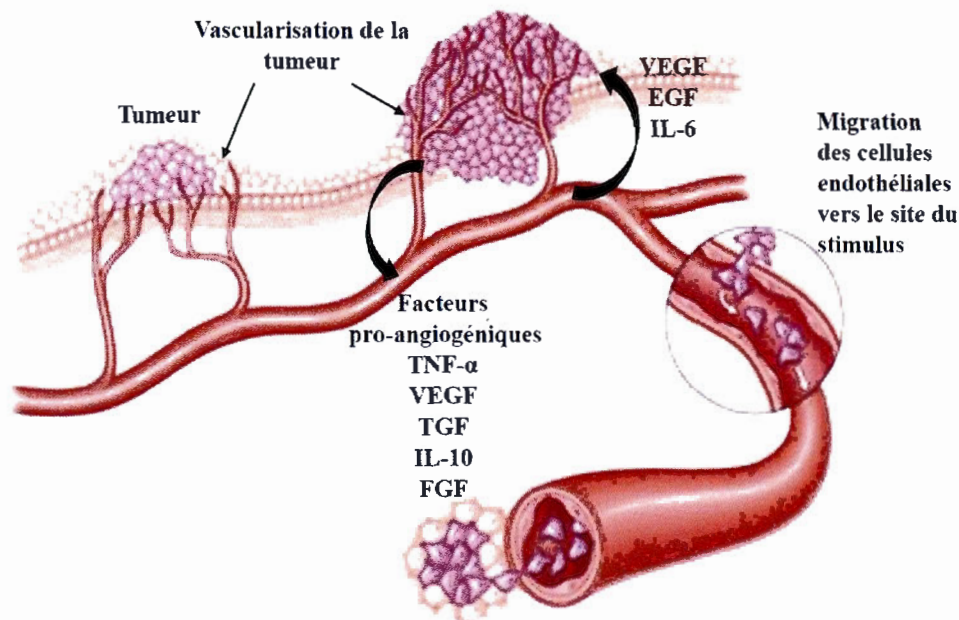


1.11 Comparaison entre l'angiogenèse normale et l'angiogenèse tumorale

(A) Structures de la vascularisation normale et organisée versus anormale et aléatoire. (B) Changements au niveau du péricyte (rouge) et de la membrane basale (bleu). (C) Équilibre entre les facteurs anti et pro-angiogéniques. Adaptée de (Jain, 2005)

La majorité des recherches de Folkman, considéré comme le fondateur des découvertes sur l'angiogenèse, a porté sur l'angiogenèse tumorale. En effet, Folkman avait suggéré depuis plus de 40 ans que l'angiogenèse pathologique est nécessaire pour nourrir et vasculariser les cellules tumorales (Folkman, Judah, 1971). Celles-ci ont besoin d'oxygène et de nutriments pour se développer au-delà de $1\text{-}2\text{ mm}^3$, c'est ainsi qu'elles attirent les vaisseaux sanguins adjacents pour leur fournir de l'oxygène et éviter de rester en hypoxie (manque d'oxygène). Cette étape ne peut être déclenchée que par l'angiogenèse (Ahluwalia *et al.*, 2014 ; Folkman, J., 2006a, 2006b).

Le développement des tumeurs solides nécessite l'activation massive de l'angiogenèse qui se fait par l'émission de signaux angiogéniques du foyer hypoxique de la tumeur vers les cellules endothéliales. Ce processus se traduit par une sécrétion de cytokines telles que le $\text{TNF-}\alpha$ et de différents facteurs de croissance dont principalement le VEGF dans l'environnement tumoral (Gomes *et al.*, 2013 ; Munoz-Chapuli, 2011). Les cellules endothéliales utilisent ces chimioattractants pour s'activer et sécrètent, en réponse, des enzymes protéolytiques telles que les MMPs afin de dégrader la membrane basale. Le remodelage de la membrane facilite ainsi la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Les cellules finissent par sécréter les nouvelles membranes basales, recrutent les cellules périvasculaires et se réorganisent pour former le nouveau vaisseau fonctionnel (Munoz-Chapuli, 2011) (Figure 1.12). C'est en se basant sur le lien étroit tumeur-angiogenèse, que Folkman a suggéré que cibler l'angiogenèse pourrait constituer une approche thérapeutique solide pour contrer le développement des tumeurs hautement vascularisées telles les glioblastomes (Folkman, J., 2006b).



1.12 Migration des cellules endothéliales vers le foyer tumoral

Les cellules tumorales secrètent les cytokines et les facteurs de croissances qui incitent les cellules endothéliales à activer l'angiogenèse et à migrer vers le site du stimulus pour former de nouveaux vaisseaux sanguins, vasculariser la tumeur, lui fournir de l'oxygène et lui permettre de se disséminer vers les tissus environnants afin de développer des métastases. Adaptée de (Gomes *et al.*, 2013)

1.4.2 La migration cellulaire induite par le TNF- α

Plusieurs facteurs de croissance contribuent à la migration des cellules endothéliales dans le processus de l'angiogenèse tumorale. Cependant, quel est l'apport du facteur pro-inflammatoire TNF- α ? Le TNF- α contribue à la migration cellulaire en stimulant la production des gènes codant pour une famille de récepteurs tyrosine-kinases dans l'endothélium, les éphrines-A1. Cet effet angiogénique indirect du TNF- α est médié à

travers ses récepteurs TNF-R1 et TNF-R2 et est induit par la voie SAPK/JNK. La voie p38/MAPK contribue également à la migration induite par le TNF- α (Cheng et Chen, 2001). D'autre part, il a été démontré que les eïcosanoides synthétisés par les COX-2 sont angiogéniques *in vivo* et stimulent la migration des cellules endothéliales. En effet, ils activent la survie cellulaire via la voie PI3K/AKT (Gately et Kerbel, 2003). Les PGE₂, produit principal des COX-2, favorisent quant à elles l'adhésion et la diffusion cellulaire via l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et sont aussi essentielles à la migration des cellules. Ceci illustre l'implication des PGE₂ dans l'angiogenèse tumorale et met en évidence que les inhibiteurs des COX-2 sont dotés d'un caractère antiangiogénique et représentent donc une cible fort intéressante afin de contrer la progression des tumeurs (Dormond *et al.*, 2002).

1.5 Nutrition et cancer

1.5.1 Les composés phytochimiques

La formation des tumeurs chez les humains est un processus qui se développe sur plusieurs étapes. Durant ce processus, l'accumulation d'altérations génétiques cause la transformation progressive des cellules normales en cellules malignes (Gupta *et al.*, 2010). Malgré l'avancement de la recherche, un grand pourcentage de décès est attribué au cancer qui s'étend différemment selon les peuples dans le monde. Le mode de vie et les habitudes alimentaires sont étroitement liés au développement des cancers et sont de plus en plus étudiés en but de prévenir ces maladies. D'après le WRCF (World Research Cancer Fund), une compilation de 500 000 études épidémiologiques visant à étudier les principales causes du cancer a démontré qu'un tiers des cancers est directement lié à une mauvaise alimentation (Wiseman, 2008). Ceci incite les chercheurs à élaborer des démarches préventives contre le cancer basé sur notre diète tout en gardant l'espoir de limiter leur apparition grâce à certains aliments clés.

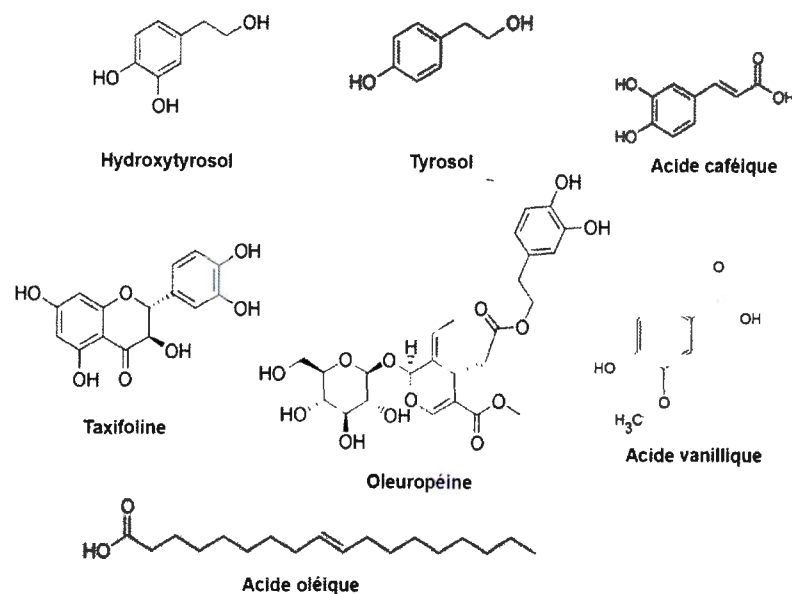
Il est de nos jours connu qu'une nutrition appropriée pourrait prévenir approximativement 35% de la mort causée par le cancer, et que plus de 90% de certains cancers peuvent être évités par une diète renforcée en nutriments antioxydants et anti-inflammatoires provenant des fruits et des légumes (Gupta *et al.*, 2010).

Plusieurs agents diététiques retrouvés dans les fruits, les légumes et les épices ont été largement étudiés en vue de leurs effets curatifs mais surtout préventifs sur diverses maladies humaines (Jiang *et al.*, 2010). Des études épidémiologiques ont démontré qu'un régime alimentaire riche en ces nutriments prévenait l'incidence de maladies cardiovasculaires, neurologiques et cancéreuses par le biais de différents mécanismes qui n'ont pas été totalement expliqués de nos jours (Chen, Michael et Butler-Manuel, 2012 ; Jiang *et al.*, 2010). La recherche effectuée au cours des dernières années est parvenue à mettre en évidence la présence en très grandes quantités de molécules chimiques organiques d'origine végétale, appelées composés phytochimiques, ayant la capacité d'interférer avec divers enzymes et gènes impliqués dans le développement des cancers (MMPs, COX-2, TNF- α , iNOS...) (Jiang *et al.*, 2010). Ces molécules font partie de familles chimiques bien définies, par exemple les polyphénols, les composés sulfurés et les terpènes qui se retrouvent naturellement dans plusieurs types d'aliments de notre diète tels que les bleuets, les fraises, les brocolis, les épices, le chocolat noir, le thé, le vin rouge et l'huile d'olive extra-vierge. Ces composés représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation, réduisent la cancérogenèse et inhibent l'angiogenèse tumorale (Béliveau et Gingras, 2007).

1.5.2 Le régime méditerranéen

Le régime méditerranéen est un style traditionnel de nutrition très recommandé pour sa bonne qualité et la répartition d'aliments qu'il adopte. Ce régime est spécifique aux pays localisés à proximité de la mer méditerranée (Gardener *et al.*, 2011). Il est connu

à travers le monde pour être un régime santé et préventif pour le développement de plusieurs maladies chroniques telles que le diabète de type II, l'augmentation de la pression artérielle et l'obésité (Psaltopoulou *et al.*, 2004). De plus, le régime méditerranéen est associé à une faible incidence des maladies cérébrales et cardiovasculaires, de l'athérosclérose, et de certains types de cancer (Cicerale *et al.*, 2009). Des études épidémiologiques ont démontré que les taux de mortalités associées aux maladies cardiovasculaires sont plus réduits dans les régions méditerranéennes comparées aux pays de l'Amérique du Nord (Gardener *et al.*, 2011 ; Mena *et al.*, 2009). Contrairement aux habitudes américaines, ce régime est basé sur une consommation quotidienne considérable en fruits, légumes, céréales et poissons (riche en acides gras) et une faible consommation en viandes rouges (Mena *et al.*, 2009). Le recours aux produits issus de l'olivier remonte à plusieurs siècles (Barbaro *et al.*, 2014). L'huile d'olive constitue la base essentielle et le point commun entre les différentes régions qui adoptent la diète méditerranéenne traditionnelle caractérisée par une composition élevée en acides gras monoinsaturés. Plusieurs chercheurs la considèrent comme étant une source importante de composés dotés de pouvoirs antioxydants et anti-inflammatoires et ont axé leurs recherches sur ses effets préventifs et bénéfiques pour la santé (Figure 1.13) (Domitrovic *et al.*, 2012 ; Rietjens *et al.*, 2007).



1.13 Structures et différences chimiques de quelques composés phytochimiques retrouvés dans l'huile d'olive

Les composés de l'huile d'olive diffèrent entre eux par leur composition chimique (phénols et acide gras monoinsaturé). Cette variabilité structurale leur confère des fonctions antioxydantes, anti-inflammatoires et antitumorales polyvalentes et complémentaires sur les cibles cancéreuses. Adaptée de (Lamy *et al.*, 2014)

1.5.2.1 Les effets bénéfiques de l'huile d'olive

Une étude effectuée sur une population méditerranéenne, dont le régime alimentaire est basé sur la consommation d'huile d'olive extra vierge, a mis en évidence les effets biologiques actifs exercés par les composés phénoliques naturellement présents dans ce nutriment. Les effets cardiopréventifs des composés phytochimiques issus de l'huile d'olive sont bien connus et sont attribués à leur capacité à réduire les facteurs de risques d'atteinte de crises cardiaques et de problèmes coronariens (Psaltopoulou

et al., 2004). D'autres effets positifs sont associés à la régulation de certains paramètres physiologiques tels que les dommages oxydatifs, les marqueurs inflammatoires, et les activités antimicrobiennes (Cicerale *et al.*, 2009 ; Kandaswami *et al.*, 2005).

Également, la découverte des effets anti-inflammatoires et anti-angiogéniques a été mise en évidence suite à l'adoption d'un régime basé sur la consommation systématique de l'huile d'olive (Mena *et al.*, 2009). À côté de ces évidences qui supportent nettement les effets qu'elle exerce sur la prévention des maladies chroniques, d'autres études ont démontré ses effets sur la diminution du risque d'apparition de certains cancers (Domitrovic *et al.*, 2012). Cependant, les mécanismes responsables de cet effet chimiopréventif commencent à être compris et représentent donc un domaine d'étude en pleine effervescence.

Les études actuelles indiquent clairement que les fractions phénoliques de l'huile d'olive sont responsables de leurs effets antitumoraux (Jiang *et al.*, 2010). Ces effets sont étudiés en vue de leur capacité à inhiber la prolifération des cellules tumorales et à promouvoir l'apoptose chez plusieurs lignées cellulaires cancéreuses. De plus, ces composés phénoliques démontrent une aptitude chimiopréventive grâce à leur activité antioxydante élevée entre autres en agissant contre l'action des cytokines pro-inflammatoires (Casaburi *et al.*, 2013). Une étude récente a noté une diminution de la concentration du TNF- α dans le plasma de personnes ayant ingéré 50 ml d'huile d'olive extra-vierge au bout de trois heures (Barbaro *et al.*, 2014 ; Papageorgiou *et al.*, 2011).

1.5.2.2 Les différentes classes des composés phytochimiques de l'huile d'olive

L'huile d'olive est un nutriment qui se caractérise par sa forte teneur en composés phytochimiques. Ces composés sont caractérisés par leur important rôle sur la santé humaine via la régulation de voies associées à l'inflammation (ERKs, COX-2, NF κ B...) et par leur capacité à moduler le stress oxydatif (Charoenprasert et

Mitchell, 2012). La majorité de ces composés sont des polyphénols. Charoenprasert suggère qu'il existe au moins 36 composés phénoliques distincts dans l'huile d'olive regroupés selon leurs structures chimiques similaires et que ces structures appartiennent à différents groupes dont les plus connus figurent dans le Tableau 1.1 :

Tableau 1.1 Composés antioxydants présents dans l'huile d'olive

Adapté de (Charoenprasert et Mitchell, 2012 ; Trichopoulou et Dilis, 2007)

Groupes chimiques	Sous-groupes	Exemples de composés
Composés phénoliques	Acides phénoliques	Acide vanillique, acide caféique, acide gallique, acide protocatéchique, acide homovanillique, acide o-coumarique, acide férulique, acide sinapique
	Alcools phénoliques	Hydroxytyrosol, tyrosol, aglycone oleuropéine, oleuropéine, forme dialdéhyde de l'aglycone oleuropéine
	Lignanes	(+)-1-pinorésinol, (+)-1-acétoxy-pinorésinol,
	Flavonoïdes	Apigénine, lutéoline (flavones), quercétine (flavonol), taxifoline (flavonones)
	Composés non-phénoliques	Acide cinnamique, acide élénolique
Hydrocarbures	Triterpènes	Squalène

Chlorophylles	Chlorophylles et dérivés	Phéophytine a, phéophytine b, chlorophylle α , chlorophylle b, pyrophéophytine α
Caroténoïdes	Carotènes	β -carotène
	Xanthophylles	Lutéine, néoxanthine, violaxanthine, lutéoxantyne
Tocophérols	-	α , β , γ et δ -Tocophérol

Les fonctions des composés qui figurent dans le tableau 1 sont variées. Certaines sont brièvement énoncées ci-dessous :

Les acides phénoliques sont les formes les plus simples des composés phénoliques présents dans les olives et l'huile d'olive caractérisés par la présence d'une fonction d'acide carboxylique (Charoenprasert et Mitchell, 2012).

Les alcools phénoliques sont les alcools phénoliques primaires simples tels que le tyrosol (Tyr) et l'hydroxytyrosol (HT). Ce dernier est généré par l'hydrolyse de l'oleuropéine (OL) tandis que le Tyr est un produit d'hydrolyse des ligstrosides (Charoenprasert et Mitchell, 2012).

Les flavonoïdes représentent le groupe le plus commun comprenant les composés phénoliques les plus abondants dans notre diète et dans l'huile d'olive. Ils regroupent plus de 1600 composés. Il est bien documenté qu'ils présentent un potentiel antioxydant responsable d'atténuer les maladies cardiovasculaires et les risques de cancer (Kandaswami *et al.*, 2005). Les flavonoïdes sont aussi divisés en sous-groupes dont on cite les flavones incluant l'apigénine et la lutéoline qui démontre des effets antioxydants (Shimoi *et al.*, 1998), qui sont des inhibiteurs de l'activité des facteurs de transcription incluant le NF- κ B (Kao *et al.*, 2011), de l'angiogénèse et qu'ils

préviennent la carcinogenèse (Lopez-Lazaro, 2009). On peut également citer les flavonols tels que la quercétine et les flavonones dont la taxifoline (Charoenprasert et Mitchell, 2012 ; Kandaswami *et al.*, 2005).

Les sécoïridoïdes : L'OL est la plus commune dans ce groupe. C'est un ester constitué d'HT et d'acide élénolique. L'OL est généralement le composé polyphénolique le plus abondant dans les olives qui peut atteindre une concentration supérieure à 140 mg/g d'extrait sec de l'olive jeune (Charoenprasert et Mitchell, 2012).

1.5.2.3 Les effets anti-inflammatoires et antitumoraux des composés de l'huile d'olive

L'huile d'olive est un réservoir de métabolites secondaires (composés phénoliques). Leur fraction varie entre 50 et 800 mg/Kg (Visser, Zock et Katan, 2004). Cette variabilité est liée à plusieurs facteurs dont la nature du fruit, la température, l'exposition à la lumière, les méthodes d'extraction et l'entreposage (Casaburi *et al.*, 2013). Les composés les plus abondants sont les polyphénols simples, principalement Tyr, HT et OL largement connus pour leur pouvoir anticancéreux, anti-inflammatoire et hypoglycémique (Bartoli *et al.*, 2000 ; Domitrovic *et al.*, 2012 ; Rietjens *et al.*, 2007).

HT se caractérise par un groupement catéchol qui est à l'origine de ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires et est le phénol le plus abondant dans l'huile d'olive (Charoenprasert et Mitchell, 2012 ; Rietjens *et al.*, 2007). Une étude basée sur une utilisation de OL a démontré la présence d'effets préventifs et thérapeutiques sur des maladies cardiovasculaires et cancéreuses (Domitrovic *et al.*, 2012).

Une étude récente sur la biodisponibilité des molécules de l'huile d'olive a démontré qu'après ingestion de l'huile d'olive, Tyr est absorbé à doses dépendantes chez les animaux et les humains, s'accumule dans le corps et exerce systématiquement ses

effets biologiques (Casaburi *et al.*, 2013). Lu et al avaient démontré que le Tyr atténue considérablement l'action des cytokines pro-inflammatoires notamment le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1 β . De plus, il a été démontré que Tyr régule à la baisse l'inflammation *in vitro* et *in vivo* en inhibant les voies NF- κ B, COX-2 et p38/ERK MAPKs qui orchestrent le processus inflammatoire prédominant dans le microenvironnement tumoral (Lu, J. *et al.*, 2013).

Outre les composés phénoliques, l'huile d'olive est un nutriment hautement riche en acides gras insaturés tels que l'acide oléique (AO) (Cicerale *et al.*, 2009) qui est d'ailleurs un composé antioxydant et un régulateur de la pression sanguine (Fung *et al.*, 2009). Une étude scientifique effectuée sur plus de 74,000 femmes s'échelonne sur une période de 20 ans a révélé qu'une consommation d'aliments d'origine méditerranéenne contenant de l'AO avait significativement réduit le risque de développement de maladies cardiaques et de certains cancers, et avait diminué la stimulation du récepteur nucléaire PPAR γ (récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes γ) exprimé dans les macrophages. L'AO a une activité anti-inflammatoire remarquable et il est capable d'inhiber l'expression du TNF- α (Al-Shudiefat *et al.*, 2013).

Les différents composés phytochimiques de l'huile d'olive présentent des effets pléiotropiques et ciblent essentiellement l'inhibition de l'activité des protéines kinases, l'induction de l'apoptose, l'inhibition de l'angiogenèse, la migration cellulaire et la métastase (Kandaswami *et al.*, 2005 ; Kao *et al.*, 2011 ; Lamy *et al.*, 2008 ; Lopez-Lazaro, 2009). Il a été démontré que les composés phytochimiques de l'huile d'olive inhibent l'angiogenèse tumorale en bloquant l'action du VEGF et de son récepteur VEGF-R2, la tubulogenèse, la prolifération et la migration des cellules endothéliales affectant ainsi la progression tumorale (Lamy *et al.*, 2014).

En résumé, qu'elle soit considérée comme un seul nutriment ou en tant qu'extraits purifiés, l'huile d'olive se démarque parmi les différentes autres sources de gras par

ses effets bénéfiques sur la santé humaine et pourrait être considérée dans le développement de stratégies de prévention du cancer basées sur l'alimentation.

[Cette page a été laissée intentionnellement blanche]

CHAPITRE II

ARTICLE

OLIVE OIL COMPOUNDS INHIBIT THE PARACRINE REGULATION OF TNF- α -INDUCED ENDOTHELIAL CELL MIGRATION THROUGH REDUCED CYCLOOXYGENASE-2 EXPRESSION IN GLIOBLASTOMA CELLS

Aroua Ben Saad[§], Sylvie Lamy^{*,§}, Alain Zgheib, Borhane Annabi

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre de recherche BIOMED, Département
de Chimie, Université du Québec à Montréal, Quebec, Canada

[§] Auteurs équivalents

E-mail address:

Aroua Ben Saad: ben_saad.aroua@courrier.uqam.ca

Sylvie Lamy: lamy.sylvie@uqam.ca

Alain Zgheib: zgheib.alain@uqam.ca

Borhane Annabi: annabi.borhane@uqam.ca

Keywords: COX-2; endothelial cells; Glioblastoma; Olive oil; PGE₂; TNF- α

Abbreviations: AA, arachidonic acid; BBB, blood-brain barrier; CM, conditioned media; CNS, central nervous system; COX-2, cyclooxygenase-2; ERK, extracellular signal-regulated kinase; EVOO, extra virgin olive oil; GBM, glioblastoma multiforme; HBMEC, human brain microvascular endothelial cells; HT, hydroxytyrosol; I κ B, inhibitor of κ B; IL-1 β , interleukin-1 β ; JNK, c-Jun amino-

terminal kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NF- κ B, nuclear transcription factor- κ B; OA, oleic acid; OL, oleuropein; PGE₂, prostaglandin E₂; TGF- β , transforming growth factor β ; TNF- α , tumor necrosis factor-alpha; Tyr, tyrosol; VEGF, vascular endothelial growth factor

ABSTRACT

The established causal relationship between the chronic inflammatory microenvironment, tumor development and cancer recurrence prompts for developing novel preventive strategies. Accumulating experimental, clinical and epidemiological data have provided support to the chemopreventive properties of olive oil compounds traditionally found within the Mediterranean diet. In this study, we investigated whether tyrosol (Tyr), hydroxytyrosol (HT), oleuropein (OL) and oleic acid (OA), four compounds contained in extra virgin olive oil, can prevent tumor necrosis factor (TNF)- α -induced cyclooxygenase (COX)-2 inflammation biomarker expression in a human glioblastoma cell (U-87 MG) model. We found that Tyr and OA significantly inhibited TNF- α -induced COX-2 gene and protein expression, as well as PGE₂ secretion. Both compounds also inhibited TNF- α -induced JNK and ERK phosphorylation, whereas only Tyr inhibited TNF- α -induced NF- κ B phosphorylation. Paracrine regulated migration of human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) was assessed using the growth factors-enriched conditioned media (CM) isolated from U-87 MG cells. We found that while PGE₂ triggered HBMEC migration, the CM isolated from either U-87 MG cells where COX-2 was silenced or treated with Tyr or OA featured decreased chemotactic properties. These observations demonstrate that olive oil compounds inhibit the effect of the chronic inflammatory microenvironment on glioblastoma progression through TNF- α actions, and may be useful in cancer chemoprevention.

[Cette page a été laissée intentionnellement blanche]

INTRODUCTION

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and malignant type of astrocytoma (WHO Grade IV glioma) of the central nervous system (CNS) (Chandana *et al.*, 2008). Despite extensive research in the treatment of GBMs, the combination treatment of surgery, radiotherapy and chemotherapy does not yet allow patients to live more than approximately 15 months (Juratli, Schackert et Krex, 2013b). Indeed, GBMs are among the most difficult cancers to treat due to their genetic heterogeneity, high invasive growth and vascularization (Alves *et al.*, 2011). The invasive nature of GBMs not only accounts for local tumor recurrence but also is responsible for breakdown of the blood-brain barrier (BBB) and cerebral edema formation causing serious symptoms in these patients (Vartanian *et al.*, 2014).

Inflammation processes promote to tumor development and contribute to glioma recurrence (Coussens et Werb, 2002). Proinflammatory mediators therefore play an essential role in the regulation of CNS disorders as well as in modulating the BBB functions (Stamatovic *et al.*, 2006). Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is among those pro-inflammatory cytokines which have particular attention over the past few years, in part due to its ability to contribute to glioblastoma development (Ryuto *et al.*, 1996). In fact, there is a correlation between patients with GBM and the presence of specific biomarkers in the serum that could regulate angiogenesis and inflammation processes (Chiorean *et al.*, 2014).

Cyclooxygenase (COX)-2, among the enzymes responsible for causing inflammation, has been detected in a variety of human malignant tumors (Joki *et al.*, 2000) and has been shown to induce brain edema (Badie *et al.*, 2003). There are two isoforms, COX-1 and COX-2, which convert arachidonic acid (AA) into several eicosanoids such as prostaglandin, thromboxanes and prostacyclin (Claria, 2003). Whereas COX-

1 is constitutively expressed in most tissues, COX-2 is an inducible enzyme, stimulated by growth factors, oncogenes, tumor promoters or inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1 β and TNF- α (Williams, Mann et DuBois, 1999). COX-2 plays a key role in the release and activity of proangiogenic proteins such as the prostaglandin E₂ (PGE₂) that directly stimulate endothelial cell migration and angiogenesis (Rao *et al.*, 2007), and has recently been associated with vascular endothelial growth factor (VEGF)-independent angiogenesis (Xu *et al.*, 2014). Indeed, COX-2 inhibition lead to VEGF pathway blockade, suppressed tumor vascularization and prevented metastasis. These results demonstrate the importance of the COX-2/PGE₂ pathway in mediating autocrine-paracrine mechanisms, which support tumor growth, and which may represent a potential target for the prevention/treatment of cancer.

To overcome the several therapeutic challenges related to the treatment of GBM patients, novel approaches are required to prolong survival. Over the last few years, there has been a growing interest in nutraceutical interventions which have been investigated for application towards different types of tumors, including brain tumors (Ramachandran *et al.*, 2012 ; Rooprai, Christidou et Filkington, 2003). This approach uses the anti-inflammatory and chemopreventive properties of naturally occurring agents, especially those that originate from vegetables, spices and fruits of our diet (Surh, 2003 ; Wiseman, 2008). As such, accumulating experimental, clinical and epidemiological data provide support to the traditional Mediterranean diet which is characterized by high consumption of foods from plant origin as well as relatively low consumption of red meat (Sofi *et al.*, 2010). Benefits of such diet have been shown towards cardiovascular diseases, chronic degenerative diseases and some types of cancers (Barbaro *et al.*, 2014 ; Verberne *et al.*, 2010).

This diet is rich in olive oil, especially extra virgin olive oil (EVOO), which gives rise to antioxidant and anti-inflammatory actions contributing to the prevention of

colorectal, prostate, lung, endometrial and breast cancers (Barbaro *et al.*, 2014 ; Escrich *et al.*, 2007 ; Filik et Ozyilkan, 2003 ; Pauwels, 2011 ; Pelucchi *et al.*, 2011 ; Trichopoulou *et al.*, 2000 ; Verberne *et al.*, 2010). The chemopreventive capacity of EVOO is not only due to fatty acids but also to its content in phenolic compounds such as polyphenols and flavonoids (Rafehi, Ververis et Karagiannis, 2012). Accordingly, it has been reported that oleuropein, the most abundant phenolic compound in olives (Bonoli *et al.*, 2004), inhibits LN-18 glioblastoma cell migration (Hamdi et Castellon, 2005). However, to our knowledge, besides a study of our own group (Lamy *et al.*, 2015), no study has yet tested olive oil compounds action against pro-inflammatory cytokines in glioblastoma cells. Considering the need for chemoprevention intervention in glioblastoma progression, fundamental studies are required to gain insight into the impact of olive oil compounds on cancer-associated processes. Here, we investigate the effect of three phenolic compounds (hydroxytyrosol, HT; oleuropein, OL; Tyrosol, Tyr) and of a monounsaturated fatty acid (oleic acid, OA) on TNF- α -induced COX-2 expression in glioblastoma cells. Moreover, the effect of COX-2 inhibition within the tumor microenvironment on endothelial cell migration was also investigated.

[Cette page a été laissée intentionnellement blanche]

MATERIALS AND METHODS

Materials

Olive oil compounds HT, OL, Tyr (purity $\geq 98\%$) and OA (purity $\geq 99\%$) were purchased from Extrasynthese (Lyon, France). Human recombinants TNF- α and PGE2 were obtained from EMD Millipore Corporation (Billerica, MA). Arachidonic acid was from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The anti-ERK (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) (K-23) polyclonal antibody was from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). Antibodies for NF- κ B p65, SAPK/JNK (c-Jun amino-terminal kinase), phospho-NF- κ B p65, phospho-SAPK/JNK polyclonal antibodies and phospho-ERK monoclonal antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). The anti-COX-2 monoclonal antibody was from BD Transduction Laboratories™ (Franklin Lakes, NJ). The monoclonal antibody against GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) was from Advanced Immunochemical Inc. (Long Beach, CA). Anti-mouse and anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-linked secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA) and enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Denville Scientific Inc. (Metuchen, NJ). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Thermo Scientific (Rockford, IL). All other reagents were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON).

Cell culture

A human glioblastoma cell line (U-87 MG) was purchased from the American Tissue Culture Collection (HTB-14TM) and maintained in modified Eagle's Minimum Essential Medium (Wisent, 320-036-CL) containing 10% calf serum (HyClone Laboratories, SH30541.03), 1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, P2256), 2 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Wisent, 450-202-EL). Human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) were from PromoCell GmbH (Heidelberg, Germany) and maintained in RPMI Medium (Wisent, 350-007-CL) containing 10% fetal bovine serum (Life Technologies, 12483-020), Nu-serumTM (VWR, CACB355500), endothelial cell growth supplement (EMD Millipore Corporation, 02-102) and 1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, P2256). HBMEC used in this study were restricted to use between passages 4 and 8. Cells were cultured at 37°C under a humidified 95%–5% (v/v) mixture of air and CO₂. Cells were treated with vehicle (0.1% ethanol (EtOH)) or with olive oil compounds and stimulated with TNF-α. All cellular assays were performed at 85% confluence.

Western blot analysis

U-87 MG cells were serum-starved in the presence of olive oil compounds for 24 h. To study the effects of these molecules on COX-2 protein expression, cells were pre-treated with one of these molecules for 24 h and then the medium was replaced by fresh medium containing 25 ng/mL TNF-α for 24 h. To study the phosphorylation status of NF-κB p65, ERK and JNK, the medium of the cells was replaced by fresh serum-free medium for 30 min prior to cell stimulation with 25 ng/mL TNF-α for 5 min. Cells were then washed once with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) containing 1 mM each of NaF and Na₃VO₄ and were incubated in the same buffer solution for 30 min at 4°C. The cells were solubilized on ice in lysis buffer [150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH7.4, 1 mM EDTA, 1 mM ethyleneglycol-O, O'-bis(2-

aminoethyl)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA), 0.5% (vol/vol) Nonidet P-40 and 1% (vol/vol) Triton X-100]. After electrophoresis, proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes which were then blocked 1 h at 4°C with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline/Tween 20 (TBS-T; 147 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 0.1% Tween 20). Membranes were further washed in TBS-T and incubated overnight with the indicated primary antibody in TBS-T containing 3% bovine serum albumin (BSA) and 0.01% sodium azide (NaN₃), followed by a 1 h incubation with HRP-conjugated anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies in TBS-T containing 5% nonfat dry milk. Immunoreactive material was visualized with an ECL detection system. The immunoreactive bands were quantified using the ImageJ software (NIH).

Total RNA isolation, cDNA synthesis and real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted from U-87 MG monolayers using TRIzol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 1 µg of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). cDNA was stored at -80°C prior to PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using iQ SYBR Green Supermix (BIO-RAD, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using an Iqycler iQ5 (BIO-RAD, Hercules, CA) and product detection was performed by measuring the binding of the fluorescent dye SYBR Green I to double-stranded DNA. The following primer sets were provided by QIAGEN (Valencia, CA): COX-2 (QT00040586), β -Actin (QT01680476), GAPDH (QT00079247), and PPIA (peptidylpropyl isomerase A; QT01866137). The relative quantities of target gene mRNA against an internal control, β -Actin/GAPDH/PPIA RNA, were measured by following a Δ Ct method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference (Δ Ct) between the mean values in the triplicate samples of target gene and those of β -Actin/GAPDH/PPIA RNA were calculated

using the iQ5 Optical System Software version 2.0 (BIO-RAD, Hercules, CA) and the relative quantified value (RQV) was expressed as $2^{-\Delta C_t}$. Semi-quantitative PCR was also performed to validate single amplification products which were resolved on 1.8% agarose gels containing 1 mg/mL ethidium bromide.

Cytotoxicity assays

The sensitivity of U-87 MG cells to olive oil compounds was determined *in vitro* by using the WST-1 assay (Roche Diagnostics, Montreal, QC). Briefly, after co-treatment of cells with TNF- α and olive oil compounds for 24 h, U-87 MG cells were exposed to 10 μ L of the tetrazolium salt WST-1 reagent. The soluble formazan dye produced by metabolically active cells was monitored for 60 min at 37°C. The absorbance at 450 nm was measured using a SpectraMax Plus reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Determination of PGE₂ levels from cell supernatants

U-87 MG cells were exposed to either vehicle or olive oil compounds (100 μ M) for 24 h before the addition of 25 ng/mL TNF- α for 24 h. Supernatants were subjected to low-speed centrifugation to remove cell debris and the amount of PGE₂ protein secreted by U-87 MG cells was determined using the PGE₂ EIA Kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI) according to the manufacturer's protocol.

Transfection method and RNA interference

U-87 MG cells were transiently transfected with 20 nM siRNA (Qiagen) against COX-2 (SI03038672) or scrambled sequences (AllStar Negative Control siRNA, 1027281) using the Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen, CA). Cells were treated for 24 h in the presence or absence of 25 ng/mL TNF- α . Small interfering RNA and mismatch siRNA were synthesized by QIAGEN and annealed to form duplexes.

Cell migration assay by xCELLigence biosensor system

Experiments were carried out using the Real-Time Cell Analyser (RTCA) Dual-Plate (DP) Instrument, the xCELLigence system (Roche Diagnostics, QC). This system was used according to the instructions of the supplier. Firstly, U-87 MG cells were serum-starved for 24 h. Then, cells (25,000 cells/well) were seeded in serum-free medium into a CIM-Plates 16 (Roche diagnostics). These plates are similar to conventional Transwells (8- μ m pore size) with gold electrode arrays on the bottom side of the membrane, which provide a real-time measurement of cell migration. Prior to cell seeding, the underside of the wells from the upper chamber was coated with 25 μ L of 0.15% gelatin in PBS and incubated for 1 h at 37°C. The lower chamber was filled with either growth factor-enriched conditioned media (CM) derived from U-87 MG cells treated or not with olive oil compounds (100 μ M), TNF- α (25 ng/mL), or siCOX-2 (20 nM), or with serum-free medium containing (or lacking) PGE₂ (50 ng/mL) or olive oil compounds. Prior to cell seeding, the underside of the wells from the upper chamber was coated with 25 μ L of 0.15% gelatin in PBS and incubated for 1 h at 37°C. The upper chamber of each well was filled with 100 μ L of U-87 MG cells (2.5×10^5 cells/mL). After 30 min of adhesion, cell migration was monitored every 5 min for 8 h. The impedance value was measured by the RTCA DP Instrument and was expressed as an arbitrary unit called the Cell Index which reflecting the amount of migration-active cells. Each experiment was performed in duplicate wells.

Statistical analysis

Statistical analyses were assessed with Student's t-test when one group was compared with the control group. To compare two or more groups with the control group, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's post hoc test was used. Differences with $P < 0.05$ were considered significant. All statistical analyses and graphs were performed using the GraphPad Prism software version 5.0b (San Diego, CA).

[Cette page a été laissée intentionnellement blanche]

RESULTS

Olive oil compounds inhibit TNF- α -induced COX-2 gene and protein expression in human glioblastoma cells

IL-1 β -induced COX-2 expression in U-87 glioblastoma cells was previously reported by us to be inhibiting by the flavonoid luteolin found in olive oil (Lamy *et al.*, 2015). The effects of other major olive oil compounds on another cytokine inducing COX-2, such as TNF- α , were examined. U-87 MG cells were incubated for 24 h in serum-free medium in the presence or in the absence of 100 μ M olive oil compounds. The medium was then replaced with fresh serum-free medium and the cells were stimulated with 25 ng/mL of recombinant TNF- α for 24 h. Under these conditions, TNF- α caused a marked increase in COX-2 expression (Fig. 2.1 A), whereas it was significantly inhibited by 61.7% for OA and 36.5% for Tyr, but not by HT and OL (Fig. 2.1 B). As shown in Fig. 2.1 C-D, transcriptional inhibition of COX-2 by the same compounds was observed (65.0% inhibition for OA and 36.2% inhibition for Tyr) and not related to cell death (Fig. 2.1 D). The half maximal inhibition concentrations (IC₅₀) of OA and Tyr on TNF- α -induced COX-2 expression were 15.7 μ M and 69.6 μ M, respectively (Fig. 2.1 E-F).

Oleic acid and tyrosol alter TNF- α -induced downstream signaling events in human glioblastoma cells

To investigate the mechanisms involved in the inhibitory actions of OA and Tyr on TNF- α -induced COX-2 expression, we further examined the effects of these compounds on TNF- α -induced NF- κ B and MAPK signaling pathways. Although ERK and JNK signaling pathways were reported to be activated by this proinflammatory cytokine (Aggarwal, Shishodia, Takada, *et al.*, 2006), little is known about their activation status in glioblastoma cells in comparison to TNF- α -induced

NF- κ B (Karin, 2006 ; Sareddy *et al.*, 2012). U-87 MG cells were pre-treated for 24 h with various concentrations of olive oil compounds in serum-free medium. The medium was then replaced with fresh serum-free medium without compounds for 30 min and the cells further stimulated with 25 ng/mL of recombinant TNF- α for 5 min. Total protein expression and phosphorylation status of downstream signaling intermediates possibly targeted by OA or Tyr were assessed by immunoblotting using specific antibodies. Exposure of U-87 MG cells to TNF- α markedly induced phosphorylation of NF- κ B, ERK and JNK, as determined by the ratio of unphosphorylated to phosphorylated proteins (Fig. 2.2). Both OA and Tyr compounds suppressed TNF- α -induced phosphorylation of ERK (Fig. 2.2 B) and JNK (Fig. 2.2 C), whereas pNF- κ B was unaffected by OA comparatively with Tyr (Fig. 2.2 A). Treatment with these olive oil compounds resulted in a concentration-dependent inhibition of the TNF- α -induced downstream signaling pathways. Effectively, for OA and Tyr treatments, the IC₅₀ values obtained were 51.0 μ M and 20.5 μ M for pERK inhibition (Fig. 2.2 B), 11.5 μ M and 81.3 μ M for pJNK inhibition (Fig. 2.2 C), respectively. The phosphorylation of NF- κ B was inhibited by Tyr treatment with an IC₅₀ value of 15.2 μ M (Fig. 2.2 A; right panel). Overall, these results suggest that OA is efficient to inhibit TNF- α -induced COX-2 expression via a JNK dependent pathway, whereas Tyr better targets the ERK and NF- κ B signaling in U-87 MG cells.

Oleic acid and tyrosol inhibit TNF- α -induced PGE₂ secretion by human glioblastoma cells

We next investigated whether TNF- α increased PGE₂ release by U-87 MG cells. As shown in Fig. 2.3, TNF- α effectively triggered a higher release of PGE₂ in the medium (28-fold increase) compared to untreated U-87 MG cells and this result was comparable to that obtained with AA (31-fold increase) known to produce PGE₂ by COX-2 (Brock, McNish et Peters-Golden, 1999). OA and Tyr at 100 μ M significantly reduced PGE₂ levels in cell culture media by 45.4% and 71.5%, respectively.

Gene silencing of COX-2 abrogates TNF- α -mediated migration of human brain microvascular endothelial cells

The actions of PGE₂ on tumor-associated angiogenesis are thought to involve endothelial cell migration, proliferation and tube formation (Finetti *et al.*, 2008 ; Rao *et al.*, 2007 ; Tamura, Sakurai et Kogo, 2006). Since PGE₂ is highly synthesized by COX-2-overexpressing tumors (Penglis *et al.*, 2000), we analyzed the role of COX-2-mediated paracrine regulation of microvascular endothelial cell migration. Gene silencing was performed in U-87 MG cells and specificity of COX-2 knockdown confirmed (Fig. 2.4 A-B). Moreover, COX-2 silencing also prevented TNF- α action on the COX-2/PGE₂ signaling axis involved in HBMEC migration. Accordingly, the CM harvested from U-87 MG cells where COX-2 expression was silenced, prevented TNF- α -mediated HBMEC migration (Fig. 2.4 C) suggesting that the secretion of PGE₂ was abrogated and that TNF- α /COX-2/PGE₂ pathway is important in the paracrine regulation of HBMEC migration.

Oleic acid and tyrosol inhibit human brain microvascular endothelial cell migration

Since the vascular microenvironment is important to promote glioblastoma growth, we analyzed the paracrine effect of CM derived from U-87 MG cells treated with the two most potent inhibitors olive oil compounds, OA and Tyr, in the presence of TNF- α on HBMEC migration. As shown in Fig. 2.5 A-B, the HBMEC migration induced by the CM from U-87 MG cells treated with TNF- α was inhibited in a concentration- and time-dependent manner by OA and Tyr with IC₅₀ values being observed at concentrations of 60.4 μ M for OA (Fig. 2.5 A) and 70.3 μ M for Tyr (Fig. 2.5 B).

Given that we demonstrated that OA and Tyr inhibited both TNF- α -induced COX-2 expression and PGE₂ secretion from U-87 MG cells, we further addressed whether OA or Tyr inhibit HBMEC migration by targeting directly the chemotactic activity of PGE₂. We measured cell migration after incubation of HBMECs with 50 ng/mL of recombinant PGE₂ in the presence or absence of 100 μ M of olive oil compounds. We found that PGE₂ stimulated HBMEC migration as compared to control cells and this increase was completely abolished by Tyr, whereas OA had no inhibitory effect (Fig. 2.5 C). These results suggest that these olive oil compounds blocked endothelial cell migration through different cellular mechanisms.

DISCUSSION

The incidence of brain cancer has markedly increased during the last few decades. GBMs present several challenges related to cancer cell proliferation, resistance to antiangiogenic, anti-metastatic and anti-inflammatory therapies (Alves *et al.*, 2011). A high level of COX-2 expression has been detected in gliomas and its expression correlated with the histopathological grade (Joki *et al.*, 2000). Recent studies have shown that many COX-2 inhibitors, such as nonsteroidal anti-inflammatory drugs, could act as efficient agents for cancer prevention as well as for intervention alone or in combination with current chemotherapy and radiation modalities (Penas-Prado *et al.*, 2014 ; Vera *et al.*, 2014).

TNF- α has been reported to be upregulated following radiation therapy in GBM patients (Zhou *et al.*, 2014) and that dietary antioxidants could reduce the incidence of brain tumors by down-regulating TNF- α or scavenging of free radicals (Sheweita et Sheikh, 2011). Here, we demonstrate for the first time that two specific olive oil compounds, Tyr and OA, inhibited TNF- α -induced COX-2 expression in U-87 MG cells and PGE₂ released through different signaling pathways. Although both compounds inhibited TNF- α -induced phosphorylation of MAPK, Tyr preferentially affected that of ERK compare to OA which reduced that of JNK. Moreover, the TNF- α -induced phosphorylation of NF- κ B is inhibited by Tyr, but not by OA. Consequently, the observed inhibition of PGE₂ secretion was more affected by Tyr.

It was reported that TGF- β -induced activation of ERK triggered the release of PGE₂ in osteoblastic cells, which in turn mediated cell proliferation (Ghayor, Rey et Caverzasio, 2005). Although speculative, such mechanism could similarly be involved with TNF- α in U-87 MG cells. The phosphorylation of ERK could either be directly activated by TNF- α or indirectly by an autocrine growth factor-mediated

process involving TNF- α . Consequently, activated ERK could upregulate COX-2 expression (Liu *et al.*, 2003). The facts that TNF- α -induced COX-2 expression was more affected by OA than TNF- α -induced PGE₂ secretion in U-87 MG cells, and that the angiogenic action of PGE₂ on HBMEC migration remained unaltered, support the involvement of these two mechanisms in the regulation of induction of TNF- α -mediated inflammation.

GBMs are among the most invasive and vascularized cancers. Interaction of GBM cells with their tumor microenvironment is necessary to their growth, which is limited by the emergence of new blood vessels via angiogenesis (Dvorak *et al.*, 2011). Angiogenesis and inflammation are closely linked (Costa, Incio et Soares, 2007). It was reported that TNF- α induces expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in gliomas, leading to increased brain tumor angiogenesis (Ryuto *et al.*, 1996).

In the present study, in order to recapitulate some features of the GBM microenvironment *in vitro*, growth factor-enriched media from U-87 MG cells were generated and their paracrine effects on the migration of HBMECs were analyzed. First, we demonstrated that HBMEC migration was attenuated by the CM from COX-2 silenced, supporting the role of COX-2 functions in angiogenesis. Second, the CM from U-87 MG cells stimulated with TNF- α and treated with OA or Tyr altered endothelial cell migration. The fact that Tyr inhibited PGE₂-induced endothelial cell migration is correlated with the inhibitory effects of this compound on COX-2 expression and PGE₂ release from U-87 MG cells.

We reported previously that OA but not Tyr inhibited VEGFR-2 phosphorylation and its downstream pathway leading to the inhibition of VEGF-induced human umbilical vein endothelial cell proliferation and migration (Lamy *et al.*, 2014). Since OA exerted no inhibitory effect on PGE₂-induced HBMEC migration, it is possible that

the inhibition observed by the conditioned media from U-87 MG cells stimulated with TNF- α and treated with OA be attributable to alternate angiogenic factors secreted in the medium such as VEGF.

Given the pleiotropic mode of action of OA and Tyr, a combination of these compounds could be beneficial to prevent tumor progression. Despite that EVOO provides a considerable amount of OA, it is rarely available as free fatty acids *in vivo* and represent the basic structural components of triglycerides, phospholipids and cholesterol esters (Arab, 2003). Thus, the majority of the studies on olive oil compounds bioavailability have only focused on the potential healthful effects of phenolic compounds. These studies have shown a concentration-dependent absorption of olive oil phenols in humans (Visioli *et al.*, 2000). The apparent absorption of these compounds was at least 55-66% of the ingested olive oil, which was metabolized and distributed throughout the body, even across the BBB, and was re-excreted as HT and Tyr in urine (Serra *et al.*, 2012 ; Vissers *et al.*, 2002). Depending of the type of olive cultivars and on nutritional custom, the concentration of phenols in EVOO could vary from 50 to 800 mg/kg (Vissers, Zock et Katan, 2004). Moreover, the plasma concentration of phenolic compounds after olive oil consumption in humans has been reported to be in the range of 0.1-59 μ M (Covas *et al.*, 2006 ; Suarez *et al.*, 2009). It is thus tempting to speculate that the concentration inhibitory effects, as observed in our current study, are behaviorally achievable in humans. Overall, our data suggest that the chronic inflammatory microenvironment, which drives glioblastoma growth and contributes to their neovascularization and invasiveness characteristics, may efficiently be prevented through the consumption of EVOO. Therefore, since cancer development and progression is a multi-step process, the supplementation with olive oil may represent a promising dietary intervention for the prevention and/or management of glioblastoma.

[Cette page a été laissée intentionnellement blanche]

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Julie Poirier and Annie Levert for their technical support. This work was funded by the Institutional Research Chair in Cancer Prevention and Treatment held by Dr. Borhane Annabi at UQÀM.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest.

FIGURES

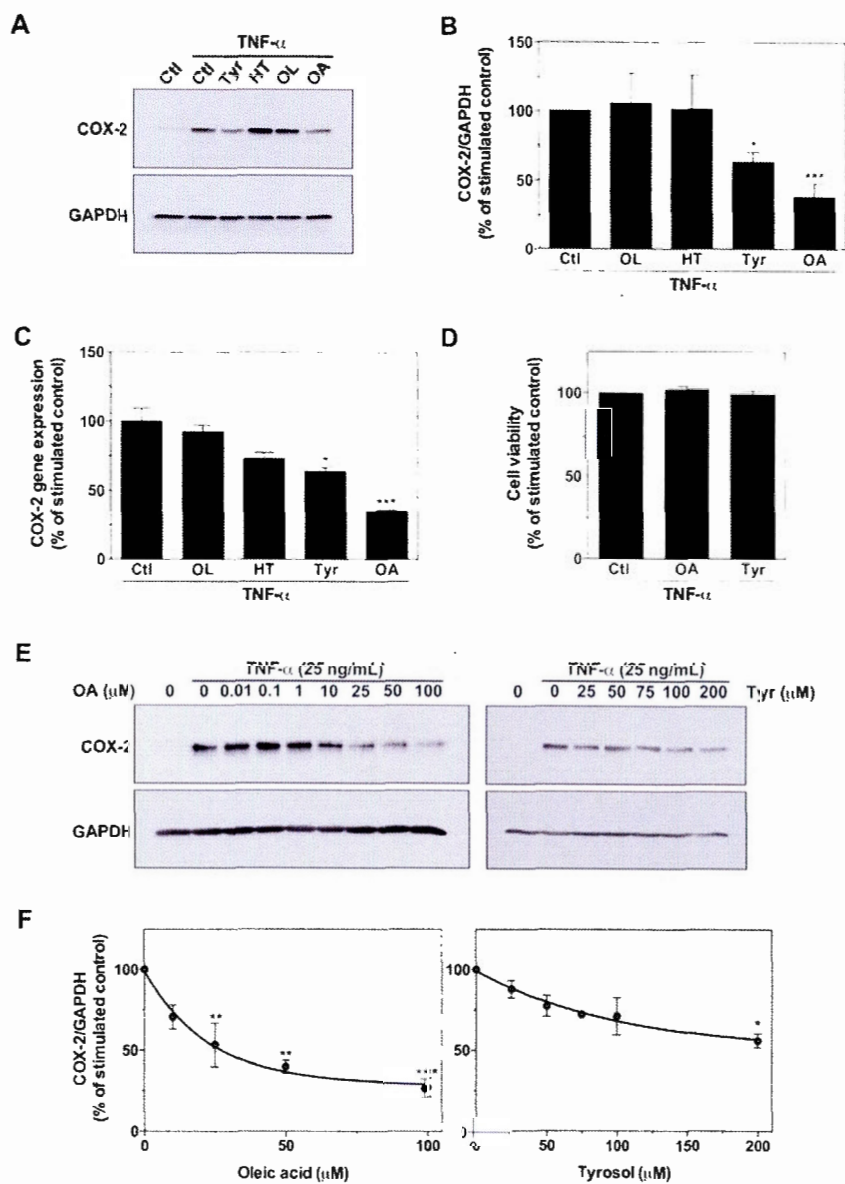


Fig.2.1

Fig.2.1: Olive oil compounds inhibit TNF- α -induced COX-2 gene and protein expression in human glioblastoma cells. U-87 MG cells were serum-starved in the presence or in the absence of 100 μ M of indicated olive oil compounds. The medium was then replaced with fresh serum-free medium and the cells were stimulated with 25 ng/mL of recombinant TNF- α for 24 h. (A) Cells were lysed and the levels of COX-2 protein expression were monitored by immunoblotting. Immunodetections obtained from representative experiments are shown. (B) The band intensities were analyzed by scanning densitometry using ImageJ software and the quantification of three independent experiments is shown. Values are means \pm SEM (* p < 0.05 and *** p < 0.001 versus TNF- α alone). For each sample, the COX-2 level was normalized for GAPDH. (C) Total RNA was isolated from conditions described above, cDNA synthesis, and qPCR performed to assess COX-2 gene expression. Values are means \pm SEM of four independent experiments (* p < 0.05 and *** p < 0.001 versus TNF- α alone). (D) Cell viability was assessed by WST-1 assay, as described in the Methods section. Values are means of two independent experiments performed in sextuplicate. (E) U-87 MG cells were serum-starved in the presence or in the absence of various concentrations of indicated olive oil compounds for 24 h and then the medium was replaced replaced by fresh medium containing 25 ng/mL TNF- α for 24 h. Immunodetections obtained from representative experiments are shown. (F) The band intensities obtained for each olive oil treatment were analyzed and corrected for GAPDH. The quantification of four independent experiments is shown. The relative levels of phosphorylated protein were also normalized to those seen in TNF- α control (value = 100). Values are means \pm SEM (* p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001 versus TNF- α alone).

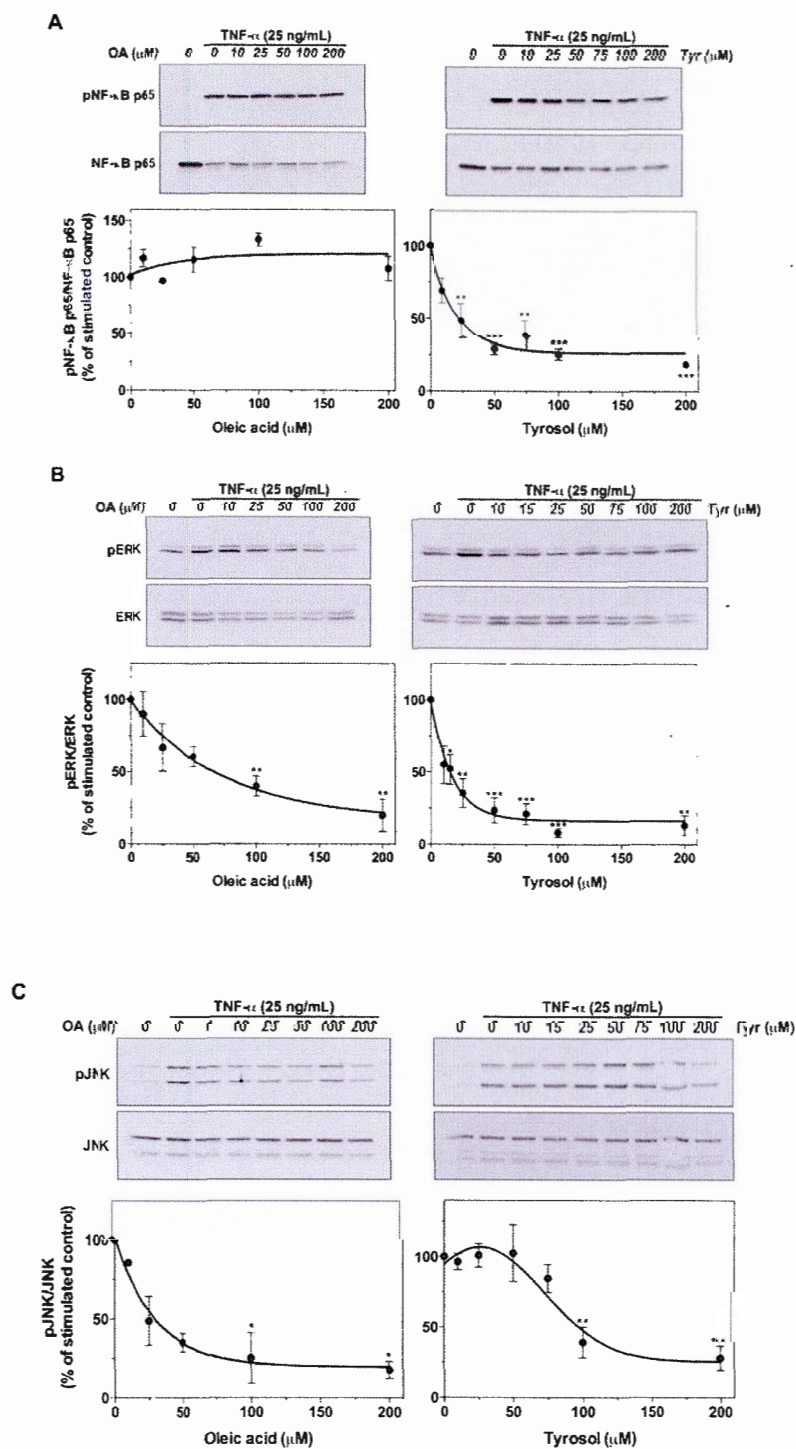


Fig.2.2

Fig.2.2: Oleic acid and tyrosol alter TNF- α -induced downstream signaling events in human glioblastoma cells. U-87 MG cells were serum-starved in the presence of various concentrations of indicated olive oil compounds for 24 h. The medium was then replaced by fresh serum-free medium for 30 min prior to cell stimulation with 25 ng/mL TNF- α for 5 min. After these treatments, the phosphorylated forms of (A) NF- κ B, (B) ERK, or (C) JNK, along with their total protein levels, were monitored by immunoblotting. Immunodetection obtained from representative experiments are shown (*top panels*). The band intensities were analyzed by densitometry using ImageJ software and expressed in arbitrary units as a ratio of levels of phosphorylated protein to those of the total protein to correct for variation in the amount of protein (*bottom panel*). The relative levels of phosphorylated protein were also normalized to those seen in TNF- α control (value = 100). Values are means \pm SEM of three independent experiments (* p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001 versus TNF- α alone).

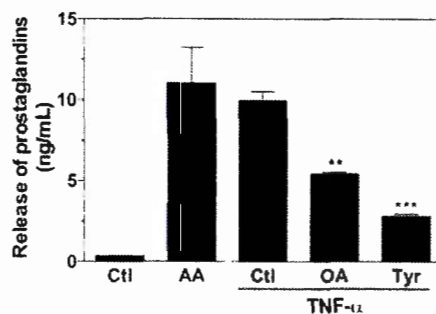


Fig.2.3: Oleic acid and tyrosol inhibit TNF- α -induced PGE₂ secretion by human glioblastoma cells. U-87 MG cells were serum-starved in the presence or in the absence of 100 μ M of indicated olive oil compounds before the addition of 25 ng/mL TNF- α for 24 h. Supernatants were collected and level of PGE₂ was measured by enzyme immunoassay. Values are means \pm SEM of two independent experiments performed in triplicate (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ versus TNF- α alone).

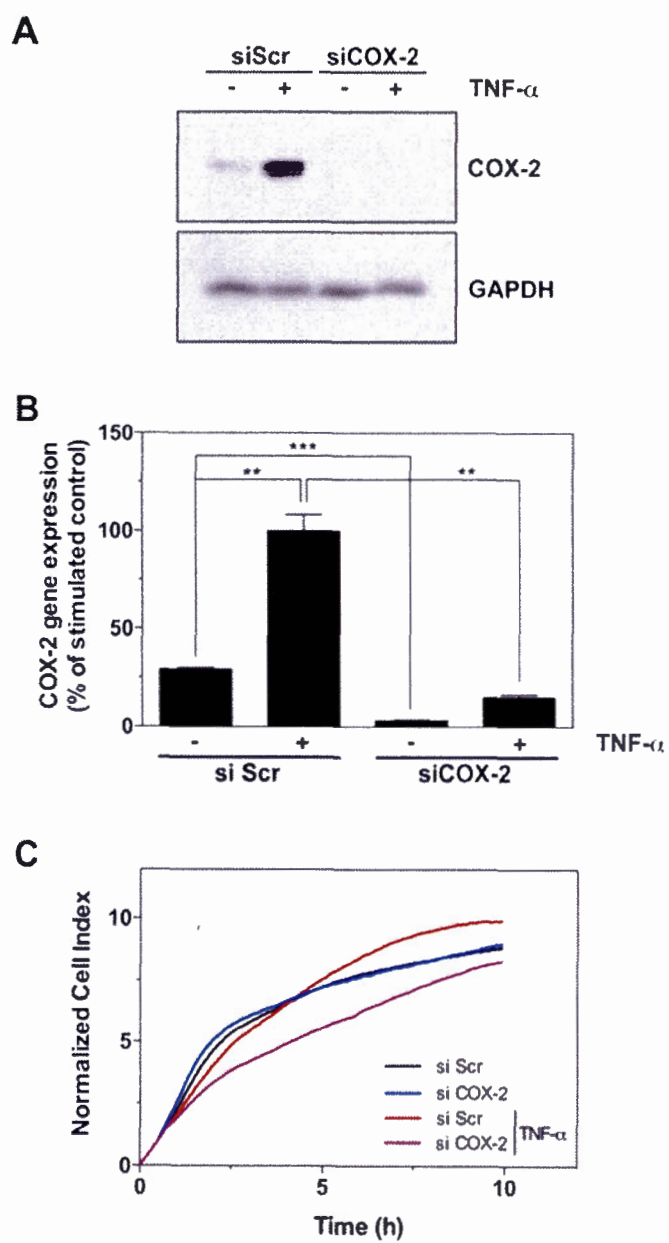


Fig.2.4

Fig.2.4: Gene silencing of COX-2 abrogates TNF- α -mediated migration of human brain microvascular endothelial. (A-B) U-87 MG cells were transiently transfected with siRNA against COX-2 (siCOX-2) or with a scrambled sequence (siScr) as described in the Methods section. (A) Representative Western blots are shown for the expression of COX-2, and GAPDH as a loading control. (B) Total RNA was extracted and qRT-PCR was used to assess COX-2 gene expression in the siScr and siCOX-2 upon treatment with 25 ng/mL TNF- α 24 h. Values are means \pm SEM of two independent experiments (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ versus TNF- α alone). (C) HBMECs were starved for 24 h before adhesion into a CIM-Plates coated with 0.15% gelatin. Then, cells were incubated with either CM derived from U-87 MG cells treated or not with TNF- α (25 ng/mL) or siCOX-2 (20 nM) as described in the Methods section. The rate of cell migration was monitored in real-time using the xCELLigence system. A representative experiment from two experiments representing impedance responses are shown. The normalized Cell index at the base-time is set to 1 in all wells.

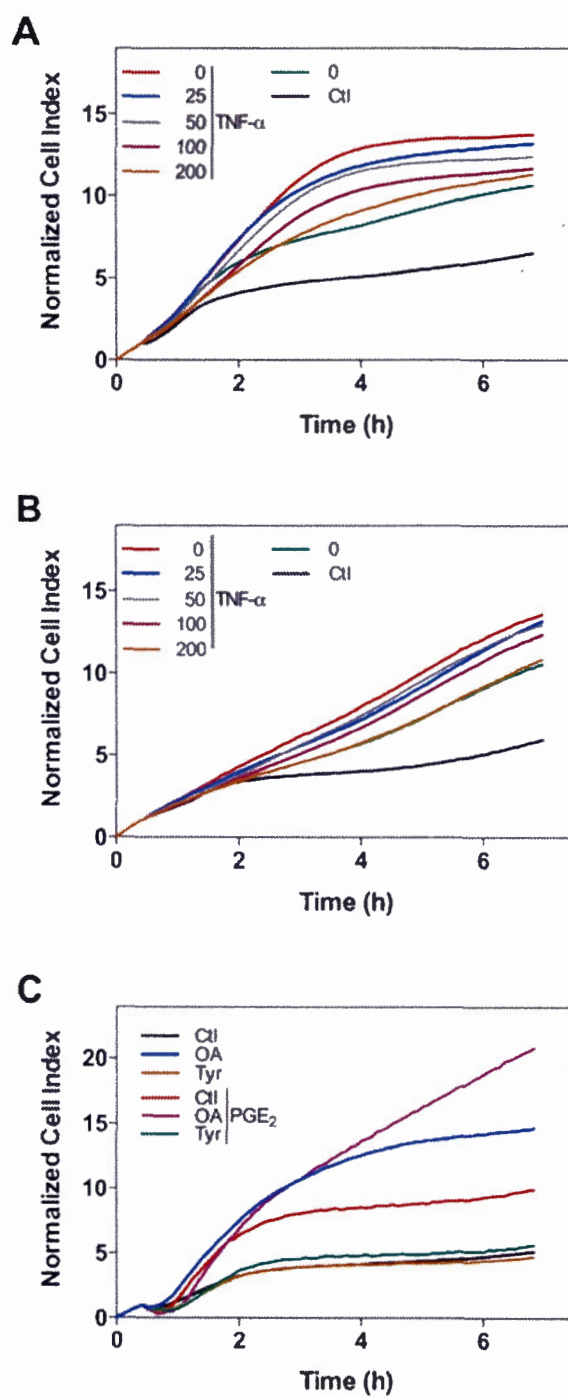


Fig.2.5

Fig.2.5: Oleic acid and tyrosol inhibit human brain microvascular endothelial cell migration. HBMEC migration was induced with either CM from U-87 MG cells treated or not with TNF- α (25 ng/mL), various concentrations of (A) OA or (B) Tyr, or (C) with serum-free medium containing (or lacking) PGE₂ (50 ng/mL) or olive oil compounds (100 μ M) as described in the Methods section. The rate of cell migration was monitored in real-time using the xCELLigence system. A representative experiment from two experiments representing impedance responses are shown. The normalized Cell index at the base-time is set to 1 in all wells.

CHAPITRE III

DISCUSSION

La dominance de l'inflammation au sein du microenvironnement tumoral constitue une aberration majeure depuis plus de 150 ans (Balkwill et Mantovani, 2001). Le lien étroit qui existe entre ces phénomènes ne cesse de motiver les chercheurs à cibler l'inflammation en vue de prévenir et de traiter les cancers. Le développement des glioblastomes multiformes est fortement supporté par la présence d'une réponse inflammatoire notamment au cours du stade de l'initiation qui est couplée à l'activation des cytokines et des facteurs de croissance résultant d'un dérèglement des cellules immunitaires. Particulièrement, le TNF- α joue un rôle crucial dans la coordination de cette progression tumorale. Il a été documenté qu'une régulation à la hausse du TNF- α est observée chez les patients atteints de glioblastomes après avoir subi une radiothérapie (Zhou *et al.*, 2014). De plus, le TNF- α induit la surexpression du VEGF ce qui explique l'augmentation de l'angiogenèse observée chez les patients atteints (Galvao et Zong, 2013 ; Juratli, Schackert et Krex, 2013a ; Kore et Abraham, 2014).

Au cours du processus inflammatoire, la suractivation du TNF- α aboutit à l'augmentation de l'expression des COX-2 et de la sécrétion des PGE₂, de l'activation de NF- κ B et des protéines MAPKs (ERK et JNK) ce qui promouvrait le développement tumoral (Harris, 1996 ; Schetter, Heegaard et Harris, 2010 ; Vane, Bakhle et Botting, 1998). L'inhibition de l'inflammation pourrait, par conséquent, constituer une démarche préventive efficace pour contrer l'activité du TNF- α afin de ralentir, voir même bloquer la progression des glioblastomes. Des évidences cliniques et épidémiologiques ont démontré que la régulation de l'inflammation chronique chez des sujets prédisposés à des maladies malignes peut être envisagée dans le but

d'établir une approche anti-inflammatoire et anti-tumorale (Thun, Henley et Patrono, 2002). Plusieurs composés antioxydants issus de notre diète tels que l'apigénine et l'acide caféique ont été documentés pour leur capacité à réduire l'inflammation en affectant entre autres l'action du TNF- α (Paracatu, Faria et Quinello, 2014 ; Zhang, X. *et al.*, 2014).

Par ailleurs, les études inspirées des effets bénéfiques associés à la diète méditerranéenne se sont multipliées. L'huile d'olive fût l'objet de la plupart de ces études. Plusieurs composés phytochimiques ont montré des effets inhibiteurs sur les cancers du sein, de la prostate, du côlon et des intestins (Casaburi *et al.*, 2013 ; Manzanares *et al.*, 2014). L'OL, composé phénolique majeur de l'huile d'olive était capable d'induire l'apoptose dans des cellules de cancer du sein via la régulation à la hausse des gènes p53 et Bax (Manzanares *et al.*, 2014). D'une autre part, des effets régulateurs des mécanismes associés au cancer colorectal ont été attribués à l'AO qui représente plus de 70% des composés antioxydants de l'huile d'olive (Carrillo, Cavia Mdel et Alonso-Torre, 2012). HT, quant à lui, est un inhibiteur potentiel du stress oxydatif et des dommages à l'ADN qui dominent dans le cancer du sein (Warleta *et al.*, 2011). Malgré ces découvertes enrichissantes en vue d'améliorer les thérapies anti cancers, il n'existe pas d'études qui ont élucidé les effets potentiels des molécules de l'huile d'olive sur l'action du TNF- α dans le cancer du cerveau.

Dans la présente étude, nous démontrons pour la première fois que deux molécules spécifiques de l'huile d'olive soient Tyr et AO ont inhibé l'expression protéique et génique de COX-2 induite par le TNF- α dans les cellules de glioblastomes de 62% et 37%, respectivement (Fig.2.1 A-C) et leurs effets ont été vérifiés par une inhibition dépendante à la concentration (Fig.2.1 E-F). De plus, la présence de Tyr et AO a diminué significativement l'induction de PGE₂, produit de synthèse des COX-2 par AA et médiateur clés de l'inflammation (Fig.2.3). Nous suggérons que ces effets inhibiteurs sur l'expression des COX-2 et la libération de PGE₂ soient médiés par

différentes voies de signalisation (Fig.2.2). Bien que les deux composés aient inhibé la phosphorylation des MAPKs (ERK et JNK) induite par le TNF- α (Fig.2.2 B-C), Tyr a affecté préférentiellement ERK de plus de 90% (Fig.2.2 B) comparé à AO qui a réduit de 80% la phosphorylation de JNK et de ERK (Fig.2.2 B-C). Il a été documenté que l'activation de la voie ERK induite par des facteurs de croissance tels que le TGF- β stimule la libération des PGE₂ (Ghayor, Rey et Caverzasio, 2005) Il est donc possible qu'un tel mécanisme soit impliqué dans l'action du TNF- α dans les U-87 et que le Tyr et l'AO agissent pour bloquer la sécrétion des PGE₂ en inhibant la phosphorylation de ERK dans les glioblastomes qui pourrait être alors directement activée par le TNF- α ou indirectement par une voie autocrine médiée par des facteurs de croissance impliquant le TNF- α .

En outre, la phosphorylation de NF- κ B induite par le TNF- α a été inhibée par Tyr mais non par AO (Fig.2.2 A). Ceci pourrait expliquer par conséquent l'inhibition observée de la sécrétion des PGE₂ qui a été plus affectée par Tyr (Fig.2.3). Toutefois, le fait que l'expression des COX-2 soit efficacement altérée par AO supporte son pouvoir inhibiteur sur la régulation de l'inflammation médiée par le TNF- α . Notons que le test de cytotoxicité WST-1 confirme que Tyr et AO ne sont pas toxiques pour les cellules et que les effets inhibiteurs observés ne sont pas dues à la mort cellulaire (Fig.2.1 D).

Mis à part l'implication des voies de transduction des MAPKs et de NF- κ B dans la diminution de l'expression des COX-2, il est tout de même intéressant d'étudier les processus cellulaires impliqués dans ce phénomène. L'interaction des glioblastomes avec leur microenvironnement tumoral est essentiel à leur développement, qui est supporté par l'apparition de nouveaux vaisseaux sanguins par l'angiogenèse (Costa, Incio et Soares, 2007). L'angiogenèse et l'inflammation induite par le TNF- α sont étroitement associées (Ryuto *et al.*, 1996). La surexpression du TNF- α dans l'environnement tumoral active des facteurs de croissance comme le VEGF qui a

pour but d'activer l'angiogenèse et la migration des cellules endothéliales pour vasculariser et nourrir la tumeur (Ahluwalia *et al.*, 2014 ; Cheng et Chen, 2001 ; Folkman, J., 1995, 2006a). De plus, il a été démontré que la présence des COX-2 ainsi que les PGE₂ induits par le TNF- α dans le microenvironnement tumoral stimule la migration des cellules endothéliales vers le site de la tumeur et activent l'angiogenèse (Gately et Kerbel, 2003). Une diminution de l'expression des COX-2 serait-elle alors couplée à une inhibition de la migration cellulaire?

Un milieu enrichi par des facteurs de croissance généré par les cellules de glioblastomes a permis d'analyser les propriétés du microenvironnement de ceux-ci et leur effets paracrines sur la migration cellulaire des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines (HBMECs). La migration des HBMECs atténuée en présence du milieu conditionné secrété par les glioblastomes suite à une transfection avec un SiCOX-2 confirme le rôle des COX-2 dans la modulation des fonctions de l'angiogenèse (Fig.2.4). De même, la migration des cellules endothéliales a subi une altération en utilisant un milieu conditionné généré par des cellules de glioblastome U-87 stimulées avec du TNF- α et traitées avec les composés Tyr et AO (Fig.2.5 A-B). De plus, le Tyr a inhibé la migration des cellules endothéliales induite par les PGE₂ (Fig.2.5 C) ce qui corrèle avec son effet inhibiteur observé sur l'expression des COX-2 et la sécrétion des PGE₂ par les U-87. D'un autre côté, l'AO n'a pas exercé d'effet inhibiteur sur la migration des HBMECs induite par les PGE₂ (Fig.2.5 C). Nous suggérons qu'il soit possible que la diminution de la migration en présence du milieu conditionné des cellules U-87 stimulées avec du TNF- α et traitées avec AO soit attribuée à l'inhibition de l'action de facteurs angiogéniques secrétés dans le milieu tels que le VEGF. Ceci serait en accord avec une étude rapportée récemment dans notre laboratoire où il a été démontré que l'AO contrairement au Tyr a inhibé la phosphorylation du VEGFR-2, la migration et la prolifération cellulaire des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine induites par le VEGF (Lamy *et al.*, 2014). D'une autre part, il a été documenté qu'en

bloquant la phosphorylation de ERK-1/2 et de SAPK/JNK, les cellules endothéliales subissent une altération de la migration (Cheng et Chen, 2001 ; Tello Velasquez *et al.*, 2014). Ceci qui supporte l'interprétation que l'inhibition de la migration observée en présence de Tyr et AO pourrait en partie être reliée à leurs autres effets inhibiteurs sur les MAPKs.

Les concentrations nécessaires pour mettre en valeur l'activité anti-oxydante des polyphénols de l'huile d'olive *in vitro* varient entre 50 et 100 μM ce qui soutient l'intervalle des concentrations que nous avons utilisées (Visser, Zock et Katan, 2004). De plus, il est estimé chez les humains que la concentration plasmatique totale que peuvent atteindre les composés phénoliques de l'huile d'olive varie entre 0,1 et 59 μM (Suarez *et al.*, 2009). Aussi, environ 55 à 66% de composés de l'huile d'olive ingérés est absorbé, métabolisé et distribué dans le corps et traversent même la barrière hémato-encéphalique (BHE) ce qui peut représenter une bonne cible pour la prévention du cancer cérébral (Serra *et al.*, 2012).

Nos résultats démontrent clairement les effets de deux des molécules testées sur la modulation de l'inflammation et sur la migration cellulaire induite par le TNF- α . Suite à notre étude, nous pouvons suggérer que les effets anti-inflammatoires et antitumoraux de l'huile d'olive sont liés à sa concentration en antioxydants, mais également à sa concentration en acides gras monoinsaturés. Bien qu'ils soient tous les deux extraits de l'huile d'olive extra vierge, la différence de la structure chimique entre AO (un acide gras) et Tyr (un phénol) pourrait expliquer la variabilité de leurs effets sur les différents médiateurs et voies de signalisation testés dans le projet. Ces effets inhibiteurs touchent COX-2, JNK et ERK avec un IC_{50} qui varie entre 15 et 80 μM . Ce sont des concentrations facilement absorbées par l'humain. Nos observations sont en accord avec d'autres études qui suggèrent que les composés phénoliques de l'huile d'olive sont absorbés de manière concentration dépendante et sont hautement biodisponibles (Visioli *et al.*, 2000). L'adoption d'une diète supplémentée en huile

d'olive extra-vierge pourrait représenter une intervention prometteuse dans la prévention des glioblastomes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le TNF- α occupe un rôle crucial dans le microenvironnement inflammatoire qui soutient le développement des glioblastomes. Il est donc essentiel de caractériser une stratégie préventive pouvant s'opposer à son effet afin de prévenir la progression du cancer cérébral. Dans le cadre de l'identification des effets des molécules d'origine nutritionnelle, la présente étude a démontré que le composé phénolique (Tyr) ainsi que l'acide gras monoinsaturé (AO) de l'huile d'olive agissent comme inhibiteurs de l'inflammation induite par le TNF- α dans les U-87. La régulation à la baisse des voies de transduction de NF- κ B et des MAPKs (ERK et JNK) conduit à l'inhibition de l'expression des COX-2 et de leurs produits de catalyse les PGE₂. Ces dernières étant bloquées, ceci empêche à son tour l'activation de la migration cellulaire et exercent un effet rétronégatif sur l'action du TNF- α pour atténuer la réponse inflammatoire. Par conséquent, les différents effets observés en présence de Tyr et AO autant sur le compartiment endothélial (HBMECs) que sur le compartiment tumoral (U-87), informent sur la richesse de l'aliment complet et contribuent à confirmer les effets préventifs du régime méditerranéen sur les cancers.

D'autres recherches seront requises pour mieux caractériser les mécanismes d'action des molécules anti-inflammatoires de l'huile d'olive. Il est envisageable d'étudier l'implication des récepteurs aux TNF- α exprimés dans les glioblastomes (TNF-R1 et TNF-R2) dans la modulation des voies de signalisation et l'expression des COX-2 en utilisant des antagonistes à ces récepteurs. Par ailleurs, IL-1 et IL-6 sont des cytokines inflammatoires ayant des activités étroitement semblables à celles du TNF- α (Macarthur, Hold et El-Omar, 2004). Il serait intéressant de vérifier les effets

potentiels des molécules de l'huile d'olive sur ces cytokines dans d'autres lignées de cancer du cerveau telles que les U-251 qui sont très invasives et résistantes aux traitements ce qui pourrait confirmer leur effets et élargir leur spectre d'action en terme de prévention du cancer de cerveau.

En outre, l'effet de l'huile d'olive peut être étudié dans un modèle *in vivo*. Les groupes de souris NUDE pourront être soumis à des traitements avec les molécules de l'huile d'olive administrées par injection dans la voie intrapéritonéale de la souris. Sinon, l'huile d'olive peut être donnée par gavage débuté 24-48h (mode préventif) avant de lui implanter de façon sous-cutanée des cellules cancéreuses cérébrales (modèle de xénogreffes sous-cutanées). Les effets seront par la suite observés sur la croissance de la tumeur implantée entre les différents groupes (témoin = aucun traitement avec l'huile d'olive; traité = traitement avec huile d'olive. Les effets de l'huile d'olive seront ainsi observés sur le taux de survie des souris. La présence des tumeurs au niveau du cerveau pourra être vérifiée par l'examen histologique du cerveau (coloration) ou par imagerie *in vivo* et les tissus pourront ainsi être prélevés pour des analyses de protéines/gènes.

La caractérisation *in vitro* au niveau moléculaire et cellulaire indique nettement le potentiel antitumoral et anti-inflammatoire des molécules de l'huile d'olive particulièrement AO et Tyr et ce à des concentrations proches des concentrations tolérées par le corps humain. Notre étude pourrait amorcer une nouvelle stratégie efficace en vue de prévenir les tumeurs cérébrales en adoptant une nutrition basée sur une utilisation systématique de l'huile d'olive.

BIBLIOGRAPHIE

- Adachi, M., Fukuda, M. et Nishida, E. (1999). Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *EMBO J*, 18(19), 5347-5358.
- Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Nat Rev Immunol*, 3(9), 745-756.
- Aggarwal, B.B., Shishodia, S., Sandur, S.K., Pandey, M.K. et Sethi, G. (2006). Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol*, 72(11), 1605-1621.
- Aggarwal, B.B., Shishodia, S., Takada, Y., Jackson-Bernitsas, D., Ahn, K.S., Sethi, G. et Ichikawa, H. (2006). TNF blockade: an inflammatory issue. *Ernst Schering Res Found Workshop*(56), 161-186.
- Ahluwalia, A., Jones, M.K., Matysiak-Budnik, T. et Tarnawski, A.S. (2014). VEGF and colon cancer growth beyond angiogenesis: does VEGF directly mediate colon cancer growth via a non-angiogenic mechanism? *Curr Pharm Des*, 20(7), 1041-1044.
- Al-Lamki, R.S. et Mayadas, T.N. (2014). TNF receptors: signaling pathways and contribution to renal dysfunction. *Kidney Int*
- Al-Shudiefat, A.A., Sharma, A.K., Bagchi, A.K., Dhingra, S. et Singal, P.K. (2013). Oleic acid mitigates TNF-alpha-induced oxidative stress in rat cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem*, 372(1-2), 75-82.
- Almeida, C.A. et Barry, S.A. (2011). Cancer basic science and clinical aspects. *Wiley-Blackwell*, 1-3.
- Alves, T.R., Lima, F.R., Kahn, S.A., Lobo, D., Dubois, L.G., Soletti, R., Borges, H. et Neto, V.M. (2011). Glioblastoma cells: a heterogeneous and fatal tumor interacting with the parenchyma. *Life Sci*, 89(15-16), 532-539.
- Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S., Sung, B. et Aggarwal, B.B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res*, 25(9), 2097-2116.

- Arab, L. (2003). Biomarkers of fat and fatty acid intake. *J Nutr*, 133 Suppl 3, 925S-932S.
- Badie, B., Schartner, J.M., Hagar, A.R., Prabakaran, S., Peebles, T.R., Bartley, B., Lapsiwala, S., Resnick, D.K. et Vorpahl, J. (2003). Microglia cyclooxygenase-2 activity in experimental gliomas: possible role in cerebral edema formation. *Clin Cancer Res*, 9(2), 872-877.
- Balkwill, F. et Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357(9255), 539-545.
- Barbaro, B., Toietta, G., Maggio, R., Arciello, M., Tarocchi, M., Galli, A. et Balsano, C. (2014). Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. *Int J Mol Sci*, 15(10), 18508-18524.
- Bartoli, R., Fernandez-Banares, F., Navarro, E., Castella, E., Mane, J., Alvarez, M., Pastor, C., Cabre, E. et Gassull, M.A. (2000). Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E(2) synthesis. *Gut*, 46(2), 191-199.
- Beliveau, R. et Gingras, D. (2007). Role of nutrition in preventing cancer. *Can Fam Physician*, 53(11), 1905-1911.
- Béliveau, R. et Gingras, D. (2006). *Foods that fight cancer: preventing cancer through diet*.
- Bonizzi, G. et Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*, 25(6), 280-288.
- Bonoli, M., Bendini, A., Cerretani, L., Lercker, G. et Toschi, T.G. (2004). Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. *J Agric Food Chem*, 52(23), 7026-7032.
- Boucherit, N., Barry, A.O., Mottola, G., Trouplin, V., Capo, C., Mege, J.L. et Ghigo, E. (2012). Effects of *Coxiella burnetii* on MAPKinases phosphorylation. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 64(1), 101-103.
- Brock, T.G., McNish, R.W. et Peters-Golden, M. (1999). Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E2. *J Biol Chem*, 274(17), 11660-11666.
- Burdan, F., Chalas, A. et Szumilo, J. (2006). [Cyclooxygenase and prostanoids--biological implications]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 60, 129-141.

- Cabannes, E., Khan, G., Aillet, F., Jarrett, R.F. et Hay, R.T. (1999). Mutations in the IkBa gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for IkappaBalpha. *Oncogene*, 18(20), 3063-3070.
- Cao, Y., Arbiser, J., D'Amato, R.J., D'Amore, P.A., Ingber, D.E., Kerbel, R., Klagsbrun, M., Lim, S., Moses, M.A., Zetter, B., Dvorak, H. et Langer, R. (2011). Forty-year journey of angiogenesis translational research. *Sci Transl Med*, 3(114), 114rv113.
- Carrillo, C., Cavia Mdel, M. et Alonso-Torre, S.R. (2012). Oleic acid inhibits store-operated calcium entry in human colorectal adenocarcinoma cells. *Eur J Nutr*, 51(6), 677-684.
- Casaburi, I., Puoci, F., Chimento, A., Sirianni, R., Ruggiero, C., Avena, P. et Pezzi, V. (2013). Potential of olive oil phenols as chemopreventive and therapeutic agents against cancer: a review of in vitro studies. *Mol Nutr Food Res*, 57(1), 71-83.
- Chandana, S.R., Movva, S., Arora, M. et Singh, T. (2008). Primary brain tumors in adults. *Am Fam Physician*, 77(10), 1423-1430.
- Chang, L. et Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824), 37-40.
- Charoenprasert, S. et Mitchell, A. (2012). Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *J Agric Food Chem*, 60(29), 7081-7095.
- Chen, S.S., Michael, A. et Butler-Manuel, S.A. (2012). Advances in the treatment of ovarian cancer: a potential role of antiinflammatory phytochemicals. *Discov Med*, 13(68), 7-17.
- Cheng, N. et Chen, J. (2001). Tumor necrosis factor-alpha induction of endothelial ephrin A1 expression is mediated by a p38 MAPK- and SAPK/JNK-dependent but nuclear factor-kappa B-independent mechanism. *J Biol Chem*, 276(17), 13771-13777.
- Chiorean, R., Berindan-Neagoe, I., Braicu, C., Florian, I.S., Leucuta, D., Crisan, D. et Cernea, V. (2014). Quantitative expression of serum biomarkers involved in angiogenesis and inflammation, in patients with glioblastoma multiforme: correlations with clinical data. *Cancer Biomark*, 14(2-3), 185-194.
- Cicerale, S., Conlan, X.A., Sinclair, A.J. et Keast, R.S. (2009). Chemistry and health of olive oil phenolics. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 49(3), 218-236.

- Claria, J. (2003). Cyclooxygenase-2 biology. *Curr Pharm Des*, 9(27), 2177-2190.
- Costa, C., Incio, J. et Soares, R. (2007). Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis*, 10(3), 149-166.
- Coussens, L.M. et Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860-867.
- Covas, M.I., de la Torre, K., Farre-Albaladejo, M., Kaikkonen, J., Fito, M., Lopez-Sabater, C., Pujadas-Bastardes, M.A., Joglar, J., Weinbrenner, T., Lamuela-Raventos, R.M. et de la Torre, R. (2006). Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. [Randomized Controlled Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Free Radic Biol Med*, 40(4), 608-616.
- Degterev, A., Boyce, M. et Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene*, 22(53), 8543-8567.
- Deininger, M.H., Weller, M., Streffer, J., Mittelbronn, M. et Meyermann, R. (1999). Patterns of cyclooxygenase-1 and -2 expression in human gliomas in vivo. *Acta Neuropathol*, 98(3), 240-244.
- Domitrovic, R., Jakovac, H., Marchesi, V.V., Sain, I., Romic, Z. et Rahelic, D. (2012). Preventive and therapeutic effects of oleuropein against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Pharmacol Res*, 65(4), 451-464.
- Dormond, O., Bezzi, M., Mariotti, A. et Ruegg, C. (2002). Prostaglandin E2 promotes integrin α V β 3-dependent endothelial cell adhesion, α 5 β 1 activation, and spreading through cAMP/PKA-dependent signaling. *J Biol Chem*, 277(48), 45838-45846.
- Dvorak, H.F. (2005). Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost*, 3(8), 1835-1842.
- Dvorak, H.F., Weaver, V.M., Tlsty, T.D. et Bergers, G. (2011). Tumor microenvironment and progression. *J Surg Oncol*, 103(6), 468-474.
- Escrich, E., Moral, R., Grau, L., Costa, I. et Solanas, M. (2007). Molecular mechanisms of the effects of olive oil and other dietary lipids on cancer. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Mol Nutr Food Res*, 51(10), 1279-1292.
- Filik, L. et Ozyilkan, O. (2003). Olive-oil consumption and cancer risk. [Letter]. *Eur J Clin Nutr*, 57(1), 191.

- Finetti, F., Solito, R., Morbidelli, L., Giachetti, A., Ziche, M. et Donnini, S. (2008). Prostaglandin E2 regulates angiogenesis via activation of fibroblast growth factor receptor-1. *J Biol Chem*, 283(4), 2139-2146.
- Fischer, A.M., Katayama, C.D., Pagès, G., Pouyssegur, J. et Hedrick, S.M. (2005). The Role of Erk1 and Erk2 in Multiple Stages of T Cell Development. *Immunity*, 23(4), 431-443.
- Folkman, J. (1971). Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine*, 285(21), 1182-1186.
- Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1(1), 27-31.
- Folkman, J. (2006a). Angiogenesis. *Annu Rev Med*, 57, 1-18.
- Folkman, J. (2006b). Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res*, 312(5), 594-607.
- Fung, T.T., Rexrode, K.M., Mantzoros, C.S., Manson, J.E., Willett, W.C. et Hu, F.B. (2009). Mediterranean diet and incidence of and mortality from coronary heart disease and stroke in women. *Circulation*, 119(8), 1093-1100.
- Galvao, R.P. et Zong, H. (2013). Inflammation and Gliomagenesis: Bi-Directional Communication at Early and Late Stages of Tumor Progression. *Curr Pathobiol Rep*, 1(1), 19-28.
- Gardener, H., Wright, C.B., Gu, Y., Demmer, R.T., Boden-Albala, B., Elkind, M.S., Sacco, R.L. et Scarmeas, N. (2011). Mediterranean-style diet and risk of ischemic stroke, myocardial infarction, and vascular death: the Northern Manhattan Study. *Am J Clin Nutr*, 94(6), 1458-1464.
- Gately, S. et Kerbel, R. (2003). Therapeutic potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in the management of tumor angiogenesis. *Prog Exp Tumor Res*, 37, 179-192.
- Geyer, M. et Wittinghofer, A. (1997). GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 7(6), 786-792.
- Ghayor, C., Rey, A. et Caverzasio, J. (2005). Prostaglandin-dependent activation of ERK mediates cell proliferation induced by transforming growth factor beta in mouse osteoblastic cells. *Bone*, 36(1), 93-100.

- Gomes, F.G., Nedel, F., Alves, A.M., Nor, J.E. et Tarquinio, S.B. (2013). Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms. *Life Sci*, 92(2), 101-107.
- Gupta, S.C., Kim, J.H., Prasad, S. et Aggarwal, B.B. (2010). Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Rev*, 29(3), 405-434.
- Hamdi, H.K. et Castellon, R. (2005). Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 334(3), 769-778.
- Hanahan, D. et Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Harris, C.C. (1996). p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and molecular epidemiology. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 1(2), 115-118.
- Henriksen, M., Johnsen, K.B., Andersen, H.H., Pilgaard, L. et Duroux, M. (2014). MicroRNA Expression Signatures Determine Prognosis and Survival in Glioblastoma Multiforme-a Systematic Overview. *Mol Neurobiol*, 50(3), 896-913.
- Huang, W.C., Chen, J.J., Inoue, H. et Chen, C.C. (2003). Tyrosine phosphorylation of I-kappa B kinase alpha/beta by protein kinase C-dependent c-Src activation is involved in TNF-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression. *J Immunol*, 170(9), 4767-4775.
- Hussein, S.Z., Mohd Yusoff, K., Makpol, S. et Mohd Yusof, Y.A. (2012). Gelam Honey Inhibits the Production of Proinflammatory Mediators NO, PGE(2), TNF-alpha, and IL-6 in Carrageenan-Induced Acute Paw Edema in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 109636.
- Jain, R.K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, 307(5706), 58-62.
- Jiang, H., Gautam, S.C., Jiang, F., Pu, P. et Chopp, M. (2010). Dietary polyphenols as a preventive and therapeutic agents in glioblastoma. *Glioblastoma: Molecular mechanisms of oathogenesis and current therapeutic strategies*, 325-335.
- Joki, T., Heese, O., Nikas, D.C., Bello, L., Zhang, J., Kraeft, S.K., Seyfried, N.T., Abe, T., Chen, L.B., Carroll, R.S. et Black, P.M. (2000). Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human glioma and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *Cancer Res*, 60(17), 4926-4931.

- Juratli, T.A., Schackert, G. et Krex, D. (2013a). Current status of local therapy in malignant gliomas--a clinical review of three selected approaches. *Pharmacol Ther*, 139(3), 341-358.
- Juratli, T.A., Schackert, G. et Krex, D. (2013b). Current status of local therapy in malignant gliomas - A clinical review of three selected approaches. *Pharmacol Ther*, 139(3), 341-358.
- Kandaswami, C., Lee, L.T., Lee, P.P., Hwang, J.J., Ke, F.C., Huang, Y.T. et Lee, M.T. (2005). The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo*, 19(5), 895-909.
- Kao, T.K., Ou, Y.C., Lin, S.Y., Pan, H.C., Song, P.J., Raung, S.L., Lai, C.Y., Liao, S.L., Lu, H.C. et Chen, C.J. (2011). Luteolin inhibits cytokine expression in endotoxin/cytokine-stimulated microglia. *J Nutr Biochem*, 22(7), 612-624.
- Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*, 441(7092), 431-436.
- Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., Metzger, D. et Chambon, P. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*, 270(5241), 1491-1494.
- Khan, M., Zheng, B., Yi, F., Rasul, A., Gu, Z., Li, T., Gao, H., Qazi, J.I., Yang, H. et Ma, T. (2012). Pseudolaric Acid B induces caspase-dependent and caspase-independent apoptosis in u87 glioblastoma cells. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 957568.
- Kis, B., Snipes, J.A. et Busija, D.W. (2005). Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *J Pharmacol Exp Ther*, 315(1), 1-7.
- Kisucka, J., Butterfield, C.E., Duda, D.G., Eichenberger, S.C., Saffaripour, S., Ware, J., Ruggeri, Z.M., Jain, R.K., Folkman, J. et Wagner, D.D. (2006). Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(4), 855-860.
- Kore, R.A. et Abraham, E.C. (2014). Inflammatory cytokines, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha, upregulated in glioblastoma multiforme, raise the levels of CRYAB in exosomes secreted by U373 glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun*

- Kyriakis, J.M. et Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, 81(2), 807-869.
- Lamy, S., Bedard, V., Labbe, D., Sartelet, H., Barthomeuf, C., Gingras, D. et Beliveau, R. (2008). The dietary flavones apigenin and luteolin impair smooth muscle cell migration and VEGF expression through inhibition of PDGFR-beta phosphorylation. *Cancer Prev Res (Phila)*, 1(6), 452-459.
- Lamy, S., Moldovan, P.L., Ben Saad, A. et Annabi, B. (2015). Biphasic effects of luteolin on interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta*, 1853(1), 126-135.
- Lamy, S., Ouanouki, A., Beliveau, R. et Desrosiers, R.R. (2014). Olive oil compounds inhibit vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. *Exp Cell Res*, 322(1), 89-98.
- Li, W.W., Li, V.W., Hutnik, M. et Chiou, A.S. (2012). Tumor angiogenesis as a target for dietary cancer prevention. *J Oncol*, 2012, 879623.
- Liang, C.J., Lee, C.W., Sung, H.C., Chen, Y.H., Wang, S.H., Wu, P.J., Chiang, Y.C., Tsai, J.S., Wu, C.C., Li, C.Y. et Chen, Y.L. (2014). Magnolol reduced TNF-alpha-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in endothelial cells via JNK/p38 and NF-kappaB signaling pathways. *Am J Chin Med*, 42(3), 619-637.
- Lin, A. et Karin, M. (2003). NF-kappaB in cancer: a marked target. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Semin Cancer Biol*, 13(2), 107-114.
- Liu, W., Reinmuth, N., Stoeltzing, O., Parikh, A.A., Tellez, C., Williams, S., Jung, Y.D., Fan, F., Takeda, A., Akagi, M., Bar-Eli, M., Gallick, G.E. et Ellis, L.M. (2003). Cyclooxygenase-2 is up-regulated by interleukin-1 beta in human colorectal cancer cells via multiple signaling pathways. *Cancer Res*, 63(13), 3632-3636.
- Lopez-Lazaro, M. (2009). Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Rev Med Chem*, 9(1), 31-59.
- Lu, H., Ouyang, W. et Huang, C. (2006). Inflammation, a key event in cancer development. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Mol Cancer Res*, 4(4), 221-233.

- Lu, J., Huang, G., Wang, Z., Zhuang, S., Xu, L., Song, B., Xiong, Y. et Guan, S. (2013). Tyrosol exhibits negative regulatory effects on LPS response and endotoxemia. *Food Chem Toxicol*, 62, 172-178.
- Macarthur, M., Hold, G.L. et El-Omar, E.M. (2004). Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 286(4), G515-520.
- Madak-Erdogan, Z., Lupien, M., Stossi, F., Brown, M. et Katzenellenbogen, B.S. (2011). Genomic collaboration of estrogen receptor alpha and extracellular signal-regulated kinase 2 in regulating gene and proliferation programs. *Mol Cell Biol*, 31(1), 226-236.
- Manzanares, M.A., Solanas, M., Moral, R., Escrich, R., Vela, E., Costa, I. et Escrich, E. (2014). Dietary extra-virgin olive oil and corn oil differentially modulate the mRNA expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in the liver and in the mammary gland in a rat chemically induced breast cancer model. *Eur J Cancer Prev*
- Mao, X.J., Zhang, X.M., Zhang, H.L., Quezada, H.C., Mix, E., Yang, X., Winblad, B., Adem, A. et Zhu, J. (2010). TNF-alpha receptor 1 deficiency reduces antigen-presenting capacity of Schwann cells and ameliorates experimental autoimmune neuritis in mice. *Neurosci Lett*, 470(1), 19-23.
- Masli, S. et Turpie, B. (2009). Anti-inflammatory effects of tumour necrosis factor (TNF)-alpha are mediated via TNF-R2 (p75) in tolerogenic transforming growth factor-beta-treated antigen-presenting cells. *Immunology*, 127(1), 62-72.
- Meister, M., Tomasovic, A., Banning, A. et Tikkanen, R. (2013). Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Scaffolding Proteins: A Recount. *Int J Mol Sci*, 14(3), 4854-4884.
- Memet, S. (2006). NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease. *Biochem Pharmacol*, 72(9), 1180-1195.
- Mena, M.P., Sacanella, E., Vazquez-Agell, M., Morales, M., Fito, M., Escoda, R., Serrano-Martinez, M., Salas-Salvado, J., Benages, N., Casas, R., Lamuela-Raventos, R.M., Masanes, F., Ros, E. et Estruch, R. (2009). Inhibition of circulating immune cell activation: a molecular antiinflammatory effect of the Mediterranean diet. *Am J Clin Nutr*, 89(1), 248-256.
- Munoz-Chapuli, R. (2011). Evolution of angiogenesis. *Int J Dev Biol*, 55(4-5), 345-351.

- Nishimoto, S. et Nishida, E. (2006). MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep*, 7(8), 782-786.
- Okada, F. (2014). Inflammation-related carcinogenesis: current findings in epidemiological trends, causes and mechanisms. *Yonago Acta Med*, 57(2), 65-72.
- Onguru, O., Gamsizkan, M., Ulutin, C. et Gunhan, O. (2008). Cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression and angiogenesis in glioblastoma. *Neuropathology*, 28(1), 29-34.
- Papageorgiou, N., Tousoulis, D., Psaltopoulou, T., Giolis, A., Antoniadis, C., Tsiamis, E., Miliou, A., Toutouzas, K., Siasos, G. et Stefanadis, C. (2011). Divergent anti-inflammatory effects of different oil acute consumption on healthy individuals. *Eur J Clin Nutr*, 65(4), 514-519.
- Paracatu, L.C., Faria, C.M. et Quinello, C. (2014). Caffeic Acid phenethyl ester: consequences of its hydrophobicity in the oxidative functions and cytokine release by leukocytes. 2014, 793629.
- Pauwels, E.K. (2011). The protective effect of the Mediterranean diet: focus on cancer and cardiovascular risk. [Review]. *Med Princ Pract*, 20(2), 103-111.
- Pelucchi, C., Bosetti, C., Negri, E., Lipworth, L. et La Vecchia, C. (2011). Olive oil and cancer risk: an update of epidemiological findings through 2010. [Meta-Analysis Review]. *Curr Pharm Des*, 17(8), 805-812.
- Penas-Prado, M., Hess, K.R., Fisch, M.J., Lagrone, L.W., Groves, M.D., Levin, V.A., De Groot, J.F., Puduvalli, V.K., Colman, H., Volas-Redd, G., Giglio, P., Conrad, C.A., Salacz, M.E., Floyd, J.D., Lohin, M.E., Hsu, S.H., Gonzalez, J., Chang, E.L., Woo, S.Y., Mahajan, A., Aldape, K.D., Yung, W.K., Gilbert, M.R., on behalf of the, M.D.A.C.C.O.P. et the Brain Tumor Trials, C. (2014). Randomized phase II adjuvant factorial study of dose-dense temozolomide alone and in combination with isotretinoin, celecoxib, and/or thalidomide for glioblastoma. *Neuro Oncol*
- Penglis, P.S., Cleland, L.G., Demasi, M., Caughey, G.E. et James, M.J. (2000). Differential regulation of prostaglandin E2 and thromboxane A2 production in human monocytes: implications for the use of cyclooxygenase inhibitors. *J Immunol*, 165(3), 1605-1611.
- Philip, M., Rowley, D.A. et Schreiber, H. (2004). Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin Cancer Biol*, 14(6), 433-439.

- Pombo, C.M., Bonventre, J.V., Avruch, J., Woodgett, J.R., Kyriakis, J.M. et Force, T. (1994). The stress-activated protein kinases are major c-Jun amino-terminal kinases activated by ischemia and reperfusion. *J Biol Chem*, 269(42), 26546-26551.
- Psaltopoulou, T., Naska, A., Orfanos, P., Trichopoulos, D., Mountokalakis, T. et Trichopoulou, A. (2004). Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr*, 80(4), 1012-1018.
- Qi, M. et Elion, E.A. (2005). MAP kinase pathways. *J Cell Sci*, 118(Pt 16), 3569-3572.
- Rafehi, H., Ververis, K. et Karagiannis, T.C. (2012). Mechanisms of action of phenolic compounds in olive. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *J Diet Suppl*, 9(2), 96-109.
- Ramachandran, C., Nair, S.M., Escalon, E. et Melnick, S.J. (2012). Potentiation of etoposide and temozolomide cytotoxicity by curcumin and turmeric force in brain tumor cell lines. *J Complement Integr Med*, 9, Article 20.
- Rao, R., Redha, R., Macias-Perez, I., Su, Y., Hao, C., Zent, R., Breyer, M.D. et Pozzi, A. (2007). Prostaglandin E2-EP4 receptor promotes endothelial cell migration via ERK activation and angiogenesis in vivo. *J Biol Chem*, 282(23), 16959-16968.
- Rath, P.C. et Aggarwal, B.B. (1999). TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol*, 19(6), 350-364.
- Rayet, B. et Gelinas, C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*, 18(49), 6938-6947.
- Rietjens, S.J., Bast, A., de Vente, J. et Haenen, G.R. (2007). The olive oil antioxidant hydroxytyrosol efficiently protects against the oxidative stress-induced impairment of the NObullet response of isolated rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292(4), H1931-1936.
- Rooprai, H.K., Christidou, M. et Pilkington, G.J. (2003). The potential for strategies using micronutrients and heterocyclic drugs to treat invasive gliomas. *Acta Neurochir (Wien)*, 145(8), 683-690.
- Roux, P.P. et Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(2), 320-344.

- Ruegg, C., Dormond, O. et Mariotti, A. (2004). Endothelial cell integrins and COX-2: mediators and therapeutic targets of tumor angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1654(1), 51-67.
- Ryu, J., Ku, B.M., Lee, Y.K., Jeong, J.Y., Kang, S., Choi, J., Yang, Y., Lee, D.H., Roh, G.S., Kim, H.J., Cho, G.J., Choi, W.S., Kim, N. et Kang, S.S. (2011). Resveratrol reduces TNF-alpha-induced U373MG human glioma cell invasion through regulating NF-kappaB activation and uPA/uPAR expression. *Anticancer Res*, 31(12), 4223-4230.
- Ryuto, M., Ono, M., Izumi, H., Yoshida, S., Weich, H.A., Kohno, K. et Kuwano, M. (1996). Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1. *J Biol Chem*, 271(45), 28220-28228.
- Saklatvala, J., Davis, W. et Guesdon, F. (1996). Interleukin 1 (IL1) and tumour necrosis factor (TNF) signal transduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 351(1336), 151-157.
- Sakurai, T. et Kudo, M. (2011). Signaling pathways governing tumor angiogenesis. *Oncology*, 81 Suppl 1, 24-29.
- Sama, D.M., Mohammad Abdul, H., Furman, J.L., Artiushin, I.A., Szymkowski, D.E., Scheff, S.W. et Norris, C.M. (2012). Inhibition of soluble tumor necrosis factor ameliorates synaptic alterations and Ca²⁺ dysregulation in aged rats. *PLoS One*, 7(5), e38170.
- Saredly, G.R., Geeviman, K., Ramulu, C. et Babu, P.P. (2012). The nonsteroidal anti-inflammatory drug celecoxib suppresses the growth and induces apoptosis of human glioblastoma cells via the NF-kappaB pathway. *J Neurooncol*, 106(1), 99-109.
- Schetter, A.J., Heegaard, N.H. et Harris, C.C. (2010). Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis*, 31(1), 37-49.
- Serra, A., Rubio, L., Borrás, X., Macia, A., Romero, M.P. et Motilva, M.J. (2012). Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. *Mol Nutr Food Res*, 56(3), 486-496.
- Sethi, G., Sung, B. et Aggarwal, B.B. (2008). TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci*, 13, 5094-5107.

- Sheweita, S.A. et Sheikh, B.Y. (2011). Can dietary antioxidants reduce the incidence of brain tumors? *Curr Drug Metab*, 12(6), 587-593.
- Shimoi, K., Okada, H., Furugori, M., Goda, T., Takase, S., Suzuki, M., Hara, Y., Yamamoto, H. et Kinae, N. (1998). Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-beta-glucoside in rats and humans. *FEBS Lett*, 438(3), 220-224.
- Simmons, D.L., Botting, R.M. et Hla, T. (2004). Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev*, 56(3), 387-437.
- Smith, W.L., Garavito, R.M. et DeWitt, D.L. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*, 271(52), 33157-33160.
- Sofi, F., Abbate, R., Gensini, G.F. et Casini, A. (2010). Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. [Meta-Analysis Review]. *Am J Clin Nutr*, 92(5), 1189-1196.
- Stamatovic, S.M., Dimitrijevic, O.B., Keep, R.F. et Andjelkovic, A.V. (2006). Inflammation and brain edema: new insights into the role of chemokines and their receptors. *Acta Neurochir Suppl*, 96, 444-450.
- Stratton, M.R., Campbell, P.J. et Futreal, P.A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719-724.
- Suarez, M., Romero, M.P., Macia, A., Valls, R.M., Fernandez, S., Sola, R. et Motilva, M.J. (2009). Improved method for identifying and quantifying olive oil phenolic compounds and their metabolites in human plasma by microelution solid-phase extraction plate and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877(32), 4097-4106.
- Surh, Y.J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*, 3(10), 768-780.
- Tamura, K., Sakurai, T. et Kogo, H. (2006). Relationship between prostaglandin E2 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in angiogenesis in human vascular endothelial cells. *Vascul Pharmacol*, 44(6), 411-416.
- Tello Velasquez, J., Watts, M.E., Todorovic, M., Nazareth, L., Pastrana, E., Diaz-Nido, J., Lim, F., Ekberg, J.A., Quinn, R.J. et John, J.A. (2014). Low-dose curcumin stimulates proliferation, migration and phagocytic activity of olfactory ensheathing cells. *PLoS One*, 9(10), e111787.

- Thun, M.J., Henley, S.J. et Patrono, C. (2002). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst*, 94(4), 252-266.
- Trichopoulou, A. et Dilis, V. (2007). Olive oil and longevity. *Mol Nutr Food Res*, 51(10), 1275-1278.
- Trichopoulou, A., Lagiou, P., Kuper, H. et Trichopoulos, D. (2000). Cancer and Mediterranean dietary traditions. [Comparative Study Review]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9(9), 869-873.
- van Horssen, R., Ten Hagen, T.L. et Eggermont, A.M. (2006). TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist*, 11(4), 397-408.
- Vane, J.R., Bakhle, Y.S. et Botting, R.M. (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 38, 97-120.
- Vartanian, A., Singh, S.K., Agnihotri, S., Jalali, S., Burrell, K., Aldape, K.D. et Zadeh, G. (2014). GBM's multifaceted landscape: highlighting regional and microenvironmental heterogeneity. *Neuro Oncol*, 16(9), 1167-1175.
- Vera, M., Barcia, E., Negro, S., Marcianes, P., Garcia-Garcia, L., Slowing, K. et Fernandez-Carballido, A. (2014). New celecoxib multiparticulate systems to improve glioblastoma treatment. *Int J Pharm*, 473(1-2), 518-527.
- Verberne, L., Bach-Faig, A., Buckland, G. et Serra-Majem, L. (2010). Association between the Mediterranean diet and cancer risk: a review of observational studies. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Nutr Cancer*, 62(7), 860-870.
- Visioli, F., Galli, C., Bornet, F., Mattei, A., Patelli, R., Galli, G. et Caruso, D. (2000). Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Lett*, 468(2-3), 159-160.
- Vissers, M.N., Zock, P.L. et Katan, M.B. (2004). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *Eur J Clin Nutr*, 58(6), 955-965.
- Vissers, M.N., Zock, P.L., Roodenburg, A.J., Leenen, R. et Katan, M.B. (2002). Olive oil phenols are absorbed in humans. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Nutr*, 132(3), 409-417.

- Warleta, F., Quesada, C.S., Campos, M., Allouche, Y., Beltran, G. et Gaforio, J.J. (2011). Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells. *Nutrients*, 3(10), 839-857.
- Williams, C.S., Mann, M. et DuBois, R.N. (1999). The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*, 18(55), 7908-7916.
- Wiseman, M. (2008). The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *Proc Nutr Soc*, 67(3), 253-256.
- Wu, Y. et Zhou, B.P. (2010). TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer*, 102(4), 639-644.
- Xu, L., Stevens, J., Hilton, M.B., Seaman, S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Logsdon, D., Morris, H., Swing, D.A., Patel, N.L., Kalen, J., Haines, D.C., Zudaire, E. et St Croix, B. (2014). COX-2 inhibition potentiates antiangiogenic cancer therapy and prevents metastasis in preclinical models. *Sci Transl Med*, 6(242), 242ra284.
- Yin, D., Wakimoto, N., Xing, H., Lu, D., Huynh, T., Wang, X., Black, K.L. et Koeffler, H.P. (2008). Cucurbitacin B markedly inhibits growth and rapidly affects the cytoskeleton in glioblastoma multiforme. *Int J Cancer*, 123(6), 1364-1375.
- Zhang, H.L., Hassan, M.Y., Zheng, X.Y., Azimullah, S., Quesada, H.C., Amir, N., Elwasila, M., Mix, E., Adem, A. et Zhu, J. (2012). Attenuated EAN in TNF-alpha deficient mice is associated with an altered balance of M1/M2 macrophages. *PLoS One*, 7(5), e38157.
- Zhang, X., Wang, G., Gurley, E.C. et Zhou, H. (2014). Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages. *PLoS One*, 9(9), e107072.
- Zhou, W., Jiang, Z., Li, X., Xu, Y. et Shao, Z. (2014). Cytokines: shifting the balance between glioma cells and tumor microenvironment after irradiation. *J Cancer Res Clin Oncol*